



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Microglial lipid metabolism: a delicate balance

Egmond, N. van

Citation

Egmond, N. van. (2025, June 18). *Microglial lipid metabolism: a delicate balance*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4250359>

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/1887/4250359>

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



Appendices

Nederlandse samenvatting

Het lipidemetabolisme van microglia: een delicate balans

Het doel van dit proefschrift was om de rol van het lipidemetabolisme in microgliale functies te onderzoeken.

Microglia ondersteunen het centrale en perifere zenuwstelsel door de eerste verdedigingslinie te vormen tegen schade en infecties. Microglia worden steeds meer erkend voor het spelen van een cruciale rol in neurodegeneratieve ziektes, wat hen tot potentiële therapeutische doelwitten maakt. Microglia reageren snel op externe signalen door passende en unieke fenotypen aan te nemen, bekend als microgliale staten. Microgliale staten werden lange tijd beschouwd als zijnde ontstekingsbevorderend of ontstekingsremmend, ofwel M1 versus M2. Dit binaire perspectief wordt steeds meer uitgedaagd door de opkomst van single-cell omics studies in neurodegeneratieve ziektes. De ontdekking van sterk gespecialiseerde microgliale staten roept twijfels op over de mogelijkheid van een 'one-size-fits-all'-benadering in de geneeskunde, waarbij het doel zou zijn om 'schadelijke' microglia te remmen of 'goede' microglia te stimuleren. Ook is de classificatie van geneesmiddelen als ontstekingsremmend of -bevorderend verouderd, omdat hun effectiviteit kan variëren afhankelijk van de microgliale staat. Dit benadrukt de noodzaak van een beter begrip van de werkingsmechanismen van geneesmiddelen inclusief de staatsafhankelijke functies van de eiwitten waarop ze gericht zijn.

Een disbalans in het lipidemetabolisme wordt steeds vaker geassocieerd met neurodegeneratieve ziektes. Daarom is het belangrijk om te begrijpen hoe lipiden en lipide-metaboliserende enzymen de functies van microglia reguleren. Microglia worden steeds vaker gezien als actieve bijdragers aan neurodegeneratie progressie. Gezien het verband tussen neurodegeneratieve ziektes en een disfunctioneel lipidemetabolisme, beoogt dit proefschrift het lipidemetabolisme in microglia biologie te verkennen, met specifieke aandacht voor lipideroutes die mogelijk geschikt zijn voor therapeutische interventie.

In **Hoofdstuk 1** werd een overzicht gegeven van microglia biologie. In tegenstelling tot neuronen en andere gliacellen zijn microglia afkomstig uit de dooierzak en koloniseren zij de hersenen tijdens de vroege embryonale ontwikkeling. Microglia komen voor in diverse fysieke vormen en functionele staten, die langdurig aanhouden of snel kunnen veranderen in reactie op lokale omgevingssignalen. Microglia zijn sterk gespecialiseerd in de opruiming van overvloedig neuronale materiaal, witte stof, dode cellen en pathogenen. Dit benadrukt hun cruciale rol tijdens zowel neuroontwikkeling als neurodegeneratie.

Hoofdstuk 2 beschreef de eerste karakterisering van microglia activatiestaten met behulp van *activity-based protein profiling* (ABPP). ABPP maakt gebruik van chemische *probes* die irreversibel binden aan specifieke klassen van enzymen, zodat hun activiteit kan worden geanalyseerd in een vergelijkende of competitieve context. Bij competitieve ABPP ligt de

focus op de interactie tussen een enzym en een specifieke remmer, terwijl vergelijkende ABPP enzymactiviteiten karakteriseert onder verschillende biologische omstandigheden. N9 microglia werden gestimuleerd met LPS, IFN- γ , 'LPS + IFN- γ ', 'IL-4 + IL-13' of TGF- β 1 en onderworpen aan ABPP om de activiteit van serine hydrolases te karakteriseren. Deze experimenten onthulden een grote variëteit aan serine hydrolase activiteiten in verschillende microglia activatiestaten. Hierarchische clustering van deze enzymactiviteitsdata identificeerde 'cluster 2' als bijzonder opmerkelijk. Deze had tegengestelde activiteitsniveaus tussen ontstekingsbevorderende en ontstekingsremmende microglia activatiestaten. Opvallend was dat de endocannabinoïde enzymen DAGL β en ABHD12 unieke activiteitspatronen vertoonden, waarbij de activiteit van DAGL β sterk gecorreleerd was met de mRNA transcriptniveaus en eiwitexpressie. Daarentegen correleerden de activiteitsniveaus van ABHD12 nauwelijks met de transcript- en eiwitniveaus. Lipide analyse werd ook toegepast op deze microglia activatiestaten en identificeerde de endocannabinoïden 2-arachidonoylglycerol (2-AG) en *N*-acylethanolamine (AEA), evenals arachidonzuur (AA), als belangrijke factoren voor het onderscheiden van de verschillende microglia activatiestaten. Deze bevindingen benadrukken de betrokkenheid van het endocannabinoïdesysteem bij de modulatie van microglia activatie. Dit werd bevestigd door de remming van DAGL β - of ABHD12-activiteit, die ontstekingsremmende effecten teweegbrachten (een afname in de door LPS geïnduceerde afgifte van de cytokines TNF- α en IL-6).

In **Hoofdstuk 3** werd de rol van DAGL β in de cytokinesecretie van microglia verder onderzocht. Er werd vastgesteld dat diacylglycerol (DAG) lipase β (DAGL β) verantwoordelijk is voor de productie van 2-AG in N9 cellen (en de downstream metaboliet AA) vanuit C20:4 DAG. DAGL β is specifiek verrijkt in immuuncellen—waaronder microglia—waar het bijdraagt aan de vorming van ontstekingsbevorderende geoxideerde lipiden (*oxylipins*), welke ontstekingsreacties reguleren. Genetische inactivatie van DAGL β ("KO") verlaagde effectief de cellulaire 2-AG en AA niveaus, maar reduceerde niet de mRNA transcriptniveaus van ontstekingsbevorderende markers zoals *Tnfa*, *Il6*, *Il1b*, *Nos2*, *Ptgs2*, *Ptger2*, en *Ptger4*, na stimulatie met 25 ng/ml LPS. Verlaging van de LPS dosering naar 1-5 ng/ml onthulde echter een significante reductie in *Il6* expressie in de DAGL β KO microglia, maar dit vertaalde zich niet naar gereduceerde IL-6 eiwitsecretie. Transcriptieanalyse van 2-AG-gerelateerde genen toonde een genetische compensatie aan in de DAGL β KO microglia door andere 2-AG-producerende enzymen, zoals DAGL α en ABHD6. Acute farmacologische remming met DH376 en DO53, daarentegen, bevestigde een ontstekingsremmend effect op de door LPS-geïnduceerde secretie van IL-6, consistent met bevindingen in de literatuur.

De rol van ABHD12 in de cytokinesecretie door microglia werd onderzocht in **Hoofdstuk 4**. ABHD12 speelt een belangrijke rol in de afbraak van 2-AG tot AA in microglia, wat het een potentieel doelwit maakt om oxylipine-gedreven cytokinesecretie te blokkeren. Selectieve remming van ABHD12 door DO264 verhoogde inderdaad de

2-AG niveaus en verlaagde AA, een belangrijk substraat voor de productie van, onder andere, de oxylipine prostaglandine E2 (PGE2). De betrokkenheid van 2-AG en PGE2 in de regulatie van TNF- α en IL-6 na stimulatie van N9 microglia met LPS werd vervolgens onderzocht via behandeling met deze liganden en remmers van hun respectieve receptoren: CB2R en EP4. Een rol van 2-AG-CB2R-sigtaaltransductie bij het verminderen van de door LPS geïnduceerde cytokineafgifte werd aangetoond door de herstelling van TNF- α niveaus in ABHD12-geïnactiveerde N9 microglia na CB2R blokkade met antagonist AM630. Voor IL-6 werden de niveaus echter slechts gedeeltelijk hersteld door AM630. PGE2 bleek IL-6 secretie positief te moduleren via de EP4 receptor, waarbij aanvulling van PGE2 in ABHD12-geïnactiveerde N9 microglia de IL-6 niveaus herstelde. In primaire muismicroglia bleek ABHD12 inactivatie effectief in het verlagen van IL-6 niveaus, die eveneens werden hersteld door PGE2. Deze bevindingen toonden aan dat remming van ABHD12 activiteit ontstekingsremmende effecten kan uitoefenen op de cytokinesecretie van microglia, door zowel de 2-AG-CB2R als de PGE2-EP4-signaleringsroutes te moduleren.

Hoofdstuk 5 onderzocht de rol van ABHD12 in TGF- β -gerelateerde functies van microglia, met name in de opruiming (fagocytose) van witte stof (myeline). Myeline is een lipiderijk membraan dat door oligodendrocyten wordt gevormd en rond neuronale axonen wordt gewikkeld om snelle actiepotentiaalgeleiding mogelijk te maken. Microglia zijn cruciaal voor het recyclen van een van de grootste bouwstenen van myeline: cholesterol, wat essentieel is voor de ontwikkeling van oligodendrocyte progenitor cellen (OPC) tot myelinevormende oligodendrocyten. Dit proces is voornamelijk belangrijk voor het herstel van myeline in gedemyeliniseerde hersengebieden in neurodegeneratieve ziektes. In primaire muismicroglia werd aangetoond dat TGF- β 1 de activiteit van ABHD12 en de fagocytose van fluorescerend myelin induceerde, waarbij de inactivatie van ABHD12 door de selectieve remmer DO264 dit effect omkeerde. Een directe vergelijking van fluoroforenfunctionaliteit (pH-afhankelijk versus pH-onafhankelijk) in een tijdsafhankelijke myeline fagocytose assay liet zien dat ABHD12 inactivatie de lysosomale pH verhoogde na 4 uur, wat resulteerde in een ophoping van myeline na 24 uur. Lysosomale disfunctie door ABHD12 inactivatie in N9 microglia werd verder onderzocht met confocale microscopie. Deze analyse toonde vergrote lysosomen met een verminderde signaalsterkte van de pH-afhankelijke kleuring met LysoTracker DND-99, wat wijst op lysosomale disfunctie. *Ex vivo* fagocytose met corticale hersenplakjes en primaire muismicroglia onthulde een inductie van het lysosomale stress eiwit GPNMB, wat geassocieerd was met myeline fagocytose en tevens werd versterkt door ABHD12 inactivatie. Deze bevindingen suggereren dat ABHD12 activiteit essentieel is voor het behoud van lysosomale gezondheid, wat cruciaal is voor een correcte verwerking en recycling van myeline.

Hoofdstuk 6 rapporteerde over de globale profilering van microglia om de uitgebreide effecten van ABHD12 inactivatie te begrijpen. Naast 2-AG gebruikt ABHD12 lysophospholipiden als substraten, welke voornamelijk worden gevormd in het ER

membraan. Door gebruik te maken van de selectieve ABHD12 probe LEI-612, die bijna volledige colocalisatie met een ABHD12 antilichaam vertoonde, werd de subcellulaire localisatie van ABHD12 in primaire muismicroglia geïdentificeerd in het ER en in ER-contactpunten met mitochondriën en het Golgi-apparaat. Phospholipideprofilering toonde aan dat ABHD12 inactivatie invloed heeft op de samenstelling van phospholipiden, ook buiten de directe substraten van ABHD12, waaronder verhoogde niveaus van phosphatidylglycerol (PG). Globale eiwitprofilering bevestigde dat het ER en lysosoom de meest getroffen organellen waren. Verrijkte biologische processen includeerden ROS metabolisme, cholesterolmetabolisme, en verminderde mitochondriële respiratie en transcriptie. Opvallend was de toename van PG, een precursor voor bis(monoacylglycerol)-fosfaat (BMP), een lysosomale cofactor, alsmede eiwitten betrokken bij BMP metabolisme. De verstoringen in cholesterolmetabolisme en ROS metabolisme suggereren dat ABHD12 inactivatie ER stress veroorzaakt. Dit werd bevestigd door verhoogde expressie van markers van ER stress, waaronder p-EIF2 α , spliced *Xbp1*, *Bip*, *Chop* en *Atf4*, in primaire muismicroglia ten gevolge van ABHD12 inactivatie. Bovendien droeg de verhoogde ROS metabolisme bij aan een versterkte gevoeligheid van ABHD12-geïnactiveerde primaire muismicroglia voor ferroptose, een specifieke vorm van celdood gedreven door ijzerafhankelijke lipideperoxidatie. Deze bevindingen suggereren dat ABHD12 inactivatie primair ER stress induceert, wat op zijn beurt lysosomale en mitochondriële functies verstoort.

In **Hoofdstuk 7** werd de interactie tussen TREM2 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2), PLC γ 2 (phospholipase γ 2) en endocannabinoïdemetabolisme onderzocht in microglia die waren afgeleid van menselijke pluripotente stamcellen (iPSC). TREM2 en PLC γ 2 worden specifiek tot expressie gebracht in microglia, waar ze de overleving, fagocytose en lipidemetabolisme reguleren, en zijn tevens betrokken bij de ziekte van Alzheimer (AD). TREM2 wordt steeds meer gezien als een therapeutisch doelwit om gunstige microgliale functies te verbeteren bij AD, maar de interactie tussen PLC γ 2 en het endocannabinoïdesysteem kan risico's opleveren voor de productie van potentieel schadelijke eicosanoiden. Door gebruik te maken van twee TREM2-gerichte middelen (een groot molecuul en een klein molecuul (SM)), genetische manipulatie van *PLCG2* middels CRISPR, en lipide analyse, werd een TREM2-PLC γ 2-MAGL signaleringsroute geïdentificeerd. Activatie van TREM2 met SM 3969 bracht de fosforylatie van SYK en PLC γ 2 teweeg samen met tijdelijke verhogingen van 2-AG en AA, met MAGL geïdentificeerd als facilitator. Transcriptomische analyse met NanoString onthulde dat SM 3969 een transcriptiesignatuur activeerde die geassocieerd was met een verhoogde motiliteit en een verminderde ontstekingsreactie. *PLCG2*^{-/-} iPSC-afgeleide microglia waren niet in staat een TREM2-afhankelijk signaal te genereren en waren gevoeliger voor LPS, met een hogere productie van prostaglandine D2 (PGD2) en een versterkte ontstekingsreactie. Verhoogde basale niveaus van AA en alternatieve AA-leveringsroutes (zoals PLA2G4A) omzeilden de noodzaak van de gebruikelijke endocannabinoïde route. Interessant genoeg resulteerde

een beschermende variant, PLCG2^{P522R}, in een verminderde ontstekingsreactie, terwijl de transcriptomische respons op TREM2 activatie behouden bleef. Bovendien onderdrukte TREM2 activatie tijdens TLR4 stimulatie met LPS de productie van PGD2 tot onder de controle niveaus. Dit suggereert dat een gematigde verhoging van PLCγ2 activiteit—hetzij via TREM2 activatie met SM 3969 of door de beschermende P522R mutatie—gunstige resultaten kan opleveren bij therapeutische targeting van microgiale TREM2 bij AD.

Conclusie

Dit proefschrift demonstreert dat de delicate balans van het lipidemetabolisme in microglia de staatafhankelijke functies vormgeeft. ABPP van lipide hydrolases in verschillende microglia activatiestaten (**Hoofdstuk 2**) leidde tot mechanistische studies van geselecteerde lipide hydrolases DAGLβ (**Hoofdstuk 3**) en ABHD12 (**Hoofdstukken 4, 5 & 6**). Een TREM2 gerichte kleine molecuul werd ook geëvalueerd voor de effecten op het lipidemetabolisme in **Hoofdstuk 7**. De tegengestelde effecten van ABHD12 inactivatie op microgiale functies, die zowel ontstekingsbevorderende als ontstekingsremmende functies omvatten, tonen aan dat medicijnachtige verbindingen niet eenvoudig kunnen worden gecategoriseerd als ontstekingsbevorderend of ontstekingsremmend. Deze dichotomie benadrukt de noodzaak van een grondige evaluatie van microglia-gerichte geneesmiddelen en hun staatafhankelijke effecten, met name diegene die ingrijpen op het lipidemetabolisme gezien de delicate balans hiervan.

