

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/49552> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Mirzaian, Mina

Title: Analytical chemistry and biochemistry of glycosphingolipids : new developments and insights

Issue Date: 2017-06-14

Samenvatting

List of publications

Curriculum Vitae

Acknowledgements

Samenvatting

Summary in Dutch

Analytische chemie en biochemie van glycosphingolipiden: nieuwe ontwikkelingen en inzichten

Geavanceerde massaspectrometrie van glycosphingolipiden (GSLs) staat centraal in dit proefschrift. Het beschreven onderzoek was gericht op de karakterisering van het glycosphingolipiden metabolisme bij gezondheid en ziekte, met nadruk op de detectie en accurate kwantificering van bekende en tot nu toe onbekende GSLs en nauw gerelateerde metabolieten. Erfelijke defecten in de lysosomale degradatie van GSLs, met name glycosphingolipidose ziekte van Gaucher (GD) en de ziekte van Fabry (FD), relatief veel voorkomende lysosomale stapelingsziekten, waren hoofdthema's van onderzoek.

Het proefschrift biedt allereerst in hoofdstuk 1 achtergrondinformatie waarna in drie verschillende secties het uitgevoerde experimentele werk wordt beschreven. De eerste sectie (hoofdstukken 2-7) bestaat uit studies aan glucosphingoid basen die overmatig voorkomen bij lysosomale stapelingsziekten, de ontwikkeling van methoden voor hun nauwkeurige kwantificering in biologische monsters met UPLC-ESI-MS/MS en het gebruik hiervan ten behoeve van diagnostiek en monitoring van ziekte. De grote waarde van identieke ¹³C-gecodeerd (glyco)sphingolipiden en hun basen als interne standaarden bij massaspectrometrische kwantificering van deze lipiden in biologische materialen wordt beschreven. De tweede sectie (hoofdstukken 8 en 9) introduceert GD en FD met betrekking tot klinische aspecten en resterende diagnostische uitdagingen. De praktische waarde van lipide analyses voor zowel de GD en FD kliniek wordt beschreven. De derde sectie (hoofdstukken 10-15) betreft de pathofysiologie van lysosomale stoornissen in het GSL metabolisme en daarmee samenhangend fundamenteel onderzoek. Bewijs wordt aangeleverd voor het bestaan van adaptief metabolisme van GSLs tijdens deficiënties in de reguliere lysosomale afbraak. Tenslotte worden nieuw ontdekte aspecten van het GSL metabolisme beschreven, in het bijzonder het voorkomen van transglycosylerings reacties. Aan het proefschrift is toegevoegd een addendum aangaande gepubliceerde klinische studies bevattend eigen analytische GSL kwantificaties.

Hoofdstuk 1 beschrijft de aard en samenstelling van GSLs, evenals hun synthese en afbraak. Er wordt een overzicht gegeven van erfelijke aandoeningen in de reguliere lysosomale afbraak van GSLs resulterend in lysosomale stapelingsziekten. De bekende fysiologische functies van GSLs worden beschreven, met inbegrip van hun veronderstelde bijdrage aan insulineresistentie tijdens obesitas. Aandacht wordt besteed aan de kwantificatie van GSLs met nadruk op nieuw ontwikkelde massaspectrometrische analyses.

Hoofdstuk 2 beschrijft de ontdekking van globotriaosylsphingosine (lysoGb3) in plasma van symptomatische FD patiënten als ook weefsels van α -galactosidase A deficiënte muizen. Reversed phase HPLC chromatography maakte detectie van O-phthalaldehyde gederivatiseerde lysoGb3 mogelijk, een tot dan onbekend lipide. Plasma lysoGb3 bleek meer dan 100 keer verhoogd in plasma van mannelijke FD patiënten met een klassieke ziekte manifestatie. In plasma van de meeste symptomatische vrouwelijke FD heterozygoten bleek lysoGb3 slechts matig verhoogd. Geen duidelijke toename in plasma lysoGb3 werd geconstateerd in personen met een atypische manifestatie van FD. Afname in plasma lysoGb3 werden waargenomen bij FD patiënten in respons op behandeling met enzym vervangende therapie (enzyme replacement therapy, ERT). Een massale verhoging in lysoGb3 werd ook gemeten in weefsels van α -galactosidase A deficiënte muizen. Geconcludeerd kon worden

dat de kwantitatieve metingen van lysoGb3 de diagnose van FD kunnen ondersteunen en het mogelijk maken de respons op therapeutische interventie met ERT te vervolgen.

Hoofdstuk 3 rapporteert de ontwikkeling en toepassing van een verbeterde methode voor kwantificering van lysoGb3 in complexe biologische monsters. De procedure is gebaseerd op het extraheren van lipide uit materiaal van keuze gevolgd door UPLC-ESI-MS/MS detectie van lysoGb3 en lysoGb3-diene. Voor een verbeterde kwantificering werd een nieuw gesynthetiseerd ¹³C lysoGb3 gebruikt als interne standaard. De nieuwe procedure biedt belangrijke verbeteringen in de gevoeligheid en nauwkeurigheid van kwantificatie van lysoGb3: verhoging van lysoGb3 en lysoGb3-diene in FD materialen kunnen voldoende nauwkeurig worden bepaald om zelfs een betrouwbaar onderscheid te maken tussen normale vrouwen en draagsters van mutaties in het alpha-galactosidase A gen die leiden tot de klassieke vorm van FD. De nieuwe methode is zeer geschikt voor gebruik bij de diagnose van FD en laboratoriumbeoordeling van patiënten voor en tijdens de therapie.

Hoofdstuk 4 beschrijft de ontwikkeling van een verbeterde UPLC-ESI-MS/MS methode voor meer gevoelige en accurate kwantificatie van glucosylsphingosine (GlcSph) met gebruik van een identieke ¹³C isotoop gecodeerde standaard. Deze verbetering is essentieel voor de detectie van minieme hoeveelheden GlcSph in urine. De verhoogde niveaus van GlcSph in urine van onbehandelde GD patiënten bleken te verminderen met ERT, samenvallend met correcties in plasma markers van stapelingscellen (chitotriosidase en CCL18) en plasma GlcSph. De nieuwe methode openbaarde tevens de opmerkelijke structurele heterogeniteit van GlcSph in urine, in analogie met eerdere waarnemingen voor lysoGb3 in urine van FD patiënten. In tegenstelling tot de situatie in plasma, zijn GlcSph moleculen met een reguliere sphingoïde base slechts een mineure component van het totale GlcSph in urine. Andere gehydroxyleerde isovormen van GlcSph zijn prominent aanwezig in urine, suggererend een actieve modificatie van de sphingoïde base in de nier.

Hoofdstuk 5 rapporteert het kwantificeren van sulfatiden en lysosulfatiden in weefsels en lichaamsvloeistoffen door middel van massaspectrometrie. Sulfatiden (3-O-sulfogalactosylceramide, SM4) en hun base lysosulfatide (3-O-sulfogalactosylsphingosine) zijn verhoogd in Metachromatische leukodystrofie (MLD), een erfelijke lysosomale stapelingsziekte veroorzaakt door een tekort aan arylsulfatase A. Een gevoelige UPLC-ESI-MS/MS methodiek werd ontwikkeld voor kwantificering van sulfatiden en lysosulfatiden in urine en plasma van MLD-patiënten en plasma en weefsels van een MLD muismodel. Uit de verkregen resultaten met materialen van patienten werd geconcludeerd dat sulfatiden of lysosulfatide in plasma onvoldoende als biomarkers informatief zijn voor de kliniek.

Hoofdstuk 6 documenteert een nieuwe UPLC-ESI-MS/MS procedure voor het kwantificeren van sphingosine-1-fosfaat (S1P). Het zwitterion S1P is notoir moeilijk te kwantificeren en plasma niveaus worden beïnvloed door de bloedafname en plasma preparatie. De studie vergeleek het gebruik van ¹³C isotoop gecodeerd natuurlijk S1P en C17-S1P als interne standaarden. Om potentiële S1P afwijkingen in FD te onderzoeken, werden plasma en weefsels identiek verzameld van FD muizen en gematchte controle dieren geanalyseerd. In tegenstelling tot eerdere literatuur werd een significante toename van S1P slechts gedetecteerd in nieren van FD muizen.

Hoofdstuk 7 presenteert een multiplex UPLC-ESI-MS/MS kwantificering van de belangrijkste (glyco)sphingoïde basen in plasma monsters. Na een enkele extractie kunnen (glyco)sphingoïde basen in de bovenste water-fase worden verzameld en sphinganine, sphingosine, glucosylsphingosine,

lactosylsphingosine, lysoGb3 en lyso-sphingomyeline gelijktijdig worden gekwantificeerd door massaspectrometrie met een reeks identieke interne ¹³C gecodeerde standaarden. De aanpak kan worden uitgebreid tot een simultane kwantificatie van (glyco)sphingolipiden in hetzelfde monster. Hierbij worden (glyco)sphingolipiden (aanwezig in de onderste chloroform-fase van de lipide-extractie) ge-deacyleerd tot hun basen, met behulp van een magnetron behandeling of door enzymatische digestie, waarna een vergelijkbare multiplex kwantificering hiervan mogelijk is.

Hoofdstuk 8 presenteert een review over GD en FD, de twee meest voorkomende glycosphingolipidoses, als een inleiding op het tweede gedeelte van experimenteel werk. GD wordt veroorzaakt door erfelijke glucocerebrosidase (GBA1) tekort wat een verminderde afbraak van glucosylceramide (GlcCer) in lysosomen veroorzaakt; FD is te wijten aan erfelijke α -galactosidase A (GLA) deficiëntie wat leidt tot verminderde afbraak van globotriaosylceramide (Gb3) in lysosomen. Hoewel biochemisch nauw verwant zijn de klinische manifestaties van GD en FD geheel anders. Accumulatie van GlcCer in weefsel-macrofagen is een karakteristiek verschijnsel bij GD patiënten, terwijl bij mannelijke FD patiënten Gb3 stapeling optreedt in verschillende celtypen. Daarom maken ERT voor GD en FD gebruik van verschillende targeting strategieën: ERT voor GD gebruikt infusies met recombinant GBA1 met mannose beëindigde N-glycanen om selectieve opname door macrofagen te bevorderen, terwijl ERTs voor FD gebruik maken van recombinant GLAs met N-glycanen die mannose-6-fosfaat herkenningsignalen bevatten waardoor receptor-gemedieerde opname door alle cellen mogelijk is. De uitdagingen bij de diagnostiek van GD en FD zijn zeer verschillend. GD is een recessieve ziekte, terwijl FD X-gebonden overerft. Vrouwelijke FD heterozygoten kunnen ook ziekte ontwikkelen, hoewel in afgezwakte vorm vergeleken met mannelijke hemizygoten. Draggers voor GD blijken een verhoogd risico te hebben op α -synucleinopathies zoals de ziekte van Parkinson. Biochemische bevestiging van de diagnose van dragerschap door enzymatische activiteit meting is problematisch voor zowel GD heterozygoten als FD hemizygoten. Definitieve bevestiging van dragerschap is daarom gebaseerd op genotypering. GD en FD diagnostiek wordt verder gecompliceerd door de aanwezigheid van mutaties met onbekende betekenis in de ziektegenen GBA1 en GLA, vaak gepaard met relatief hoge overblijvende enzymactiviteit. Biomarkers, circulerende surrogaatmarkers van de ziekte, kunnen enorm helpen bij de diagnostiek. Voor GD zijn verschillende plasma eiwit biomarkers afkomstig uit pathologisch weefsel-macrofagen ontdekt, zoals chitotriosidase, CCL18 en sGPNMB. Voor FD ontbreken vergelijkbare plasma eiwit biomarkers. De detectie van lipide afwijkingen als alternatieve ziekte-markers voor GD en FD is veelbelovend. Er is een duidelijke toename in weefsels, plasma en urine van glycosphingoid basen: globotriaosylsphingosine (lysoGb3) bij FD en glucosylsphingosine (GlcSph) bij GD. Nauwkeurige kwantificering van deze glycosphingoid basen met UPLC-ESI-MS/MS maakt diagnose en monitoring van de beide ziekten mogelijk.

Hoofdstuk 9 geeft een overzicht van praktische toepassingen van lipide analyses voor de kliniek zoals geïllustreerd door een aantal publicaties bijgesloten in addendum II [ref 1-4]. In het kort, een vermindering in afname in plasma en urine (lyso)Gb3 door de vorming van antilichamen tegen het therapeutische enzym (recombinant α -galactosidase A) bij mannelijke Fabry patiënten kon worden waargenomen [1]. Toenames in plasma lysoGb3 werden waargenomen bij FD patiënten na een onvrijwillige overgang naar behandeling met lagere enzym dosis als gevolg van een tekort aan agalsidase beta [2]. Gunstige verlagingen van plasma GlcSph, vergelijkbaar met die in de biomarker chitotriosidase, werden gedetecteerd in GD patiënten die ERT en substraatreductietherapie (SRTS) met *Miglustat* en *Eliglustat* ontvingen. Correcties met ERT en *Eliglustat* behandeling waren vergelijkbaar en meer geprononceerd dan veranderingen met de *Miglustat* behandeling [3]. Tenslotte,

correcties in weefsel GlcCer en GlcSph werden waargenomen bij gentherapie van een GD muismodel, samenvallend met verbeteringen in hematologische afwijkingen, splenomegalie en aanwezigheid van stapelingscellen in beenmerg [4].

Hoofdstuk 10 biedt een overzicht van glycosphingolipide metabolisme tijdens lysosomale ziekten. Gepresenteerd wordt het aanwezige bewijs voor het bestaan van adaptief metabolisme in glycosphingolipidoses zoals GD en FD. Dit wordt verder onderbouwd door de experimentele gegevens in de navolgende hoofdstukken. De aandacht richt zich in het hoofdstuk op toenemende aanwijzingen voor toxiciteit van overmatige glycosphingoid basen bij de glycosphingolipidoses. Overmatig lysoGb3 blijkt toxisch te zijn voor podocyten en nociceptieve neuronen in sensorische zenuwen bij FD patiënten, hetgeen een verklaring biedt voor de karakteristieke albuminurie en perifere neuropathie. Overmatige GlcSph in GD patiënten wordt verondersteld te fungeren als autoantigeen, elk leidt tot B-celproliferatie en een verhoogd risico op multiple myeloom. Besproken wordt ook de potentieel toxische rol van buitensporige GlcCer metabolisme buiten het lysosoom door het cytosolische β -glucosidase GBA2 tijdens GBA1 deficiëntie.

Hoofdstuk 11 beschrijft de identificatie van het lysosomaal zure ceramidase als zijnde verantwoordelijke voor de vorming van glycosphingoid basen gedurende een lysosomaal glycosidase deficiëntie. Experimenteel werd aangetoond dat afwezigheid van het zure ceramidase, zoals bij de ziekte van Farber, de vorming van GlcSph voorkomt bij een inhibitie van het lysosomale GBA1. In lijn hiermee, de remming van de enzymatische activiteit van het zure ceramidase voorkomt eveneens de vorming van GlcSph in cellen met geïnactiveerd GBA1. Bij het onderzoek is *in vivo* sphingolipid metabolisme vervolgd door aan cellen ^{13}C -gecodeerde lipiden aan te bieden. De brede substraatspecificiteit van het zure ceramidase tijdens een intralysosomaal glycosphingolipide stress wordt gereflecteerd door verhoogde vorming van zowel GlcSph als lysoGb3 na inactivering van GBA1. Dit verschijnsel ligt zeer waarschijnlijk ten grondslag aan de waargenomen lichte verhoging in lysoGb3 in plasma van symptomatische GD patiënten, tot concentraties zoals waargenomen bij sommige individuen met veronderstelde atypische FD.

Hoofdstuk 12 rapporteert afwijkingen in glucosphingolipiden in muismodellen van FD (α -galactosidase A-deficiëntie), LIMP-2-deficiëntie (secundaire GBA1 deficiëntie), de ziekte van Krabbe (galactocerebrosidase deficiëntie) en de ernstige en mildere variant van ziekte van Niemann-Pick type C (NPC) (lysosomale cholesterol accumulatie en secundaire GBA1-deficiëntie). In alle gevallen werden verhoogde plasmaspiegels van glycosphingoid basen overeenkomend met de primaire GSL accumulatie geïdentificeerd met UPLC-ESI-MS/MS. Onderzoek van plasma van NPC patiënten wees op verhogingen van plasma GlcSph welke biochemische bevestiging van de diagnose ondersteunen. Deze studie toont wederom de waarde van nauwkeurig gekwantificeerde glycosphingoid basen voor het monitoren van glycosphingolipidoses.

Hoofdstuk 13 richt zich op muizen met een tekort in LIMP-2, de transporteur van de nieuw gevormde GBA1 van het endoplasmatisch reticulum naar lysosomen. Een tekort aan LIMP-2 in de mens veroorzaakt Action Myoclonus Renal Failure syndrome (AMRF). LIMP-2 muizen bleken grote verlagingen in GBA1 eiwit en activiteit in verschillende weefsels te vertonen, zij het in wisselende mate. In leukocyten LIMP-2 deficiënte muizen, evenals in AMRF patiënten, is de GBA1 activiteit relatief hoog. Er wordt gehypothetiseerd dat dit verschijnsel de afwezigheid van macrofagen pathologie bij AMRF patiënten verklaart, een kenmerkende afwijking bij GD patiënten. Analyses van de lipiden met

UPLC-ESI-MS/MS toonden aan dat de meeste weefsels van LIMP-2 deficiënte muizen weinig GlcCer opslaan. Daarentegen zijn GlcSph niveaus duidelijk verhoogd, wat wijst op een actieve omzetting van accumulerend GlcCer tot GlcSph via het zure ceramidase.

Hoofdstuk 14 rapporteert een tot nu toe nauwelijks bestudeerd glycolipide in gewervelden: glucosyl- β -cholesterol (GlcChol). Een UPLC-ESI-MS/MS methode, met gebruik van ^{13}C -gecodeerd GlcChol als interne standaard, werd ontwikkeld om de natuurlijke aanwezigheid van dit glycolipide aan te tonen in diverse muis weefsels en humaan plasma. Verder werd aangetoond dat GlcChol niet wordt gevormd door het UDP-glucose afhankelijke glucosylceramide synthase (GCS), maar via transglucosylering met GlcCer als glucose donor. Beide β -glucosidasen GBA1 als GBA2 zijn *in vitro* en in levende cellen in staat tot het katalyseren van deze (reversibele) transglucosylering. GBA1 bevindt zich binnen lysosomen, terwijl GBA2 is gebonden aan de cytoplasmatische zijde van de membranen. GlcCer is aanwezig, als enige GSL, aan de cytoplasmatische en lumenale zijde van specifieke membranen. Het metabolisme van GlcChol werd bestudeerd in gekweekte cellen, waaruit geconcludeerd kon worden dat onder normale omstandigheden GBA2 verantwoordelijk is voor de vorming van GlcChol en GBA1 voor zijn afbraak. In overeenstemming met deze bevindingen tonen weefsels van GBA2-deficiënte muizen fors verminderde GlcChol niveaus, terwijl glucocerebrosidase-deficiënte muizen verhoogde weefsel geglycosyleerde steroïden vertonen. Tijdens lysosomale accumulatie van cholesterol is ook GBA1 in staat tot vorming van GlcChol. Zo is GlcChol verhoogd in fibroblasten van NPC patiënten en de lever van NPC muizen. Blootstelling van gekweekte cellen aan het middel U18666A, welk een lysosomale opeenhoping van cholesterol veroorzaakt, induceert verhoogde GlcChol vorming. Dit kan worden voorkomen door inactivatie van GBA1. Bij GD patiënten is het plasma niveau van GlcChol in plasma verhoogd. Behandeling van GD patiënten met Eliglustat, een remmer van GCS en resulterend in verlaging van GlcCer, leidt tot afname van GlcChol in plasma. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de afgenomen hoeveelheid GlcCer die als Glc donor tijdens vorming van GlcChol dienst doet. Het onderzoek suggereert een geheel nieuwe metabole functie voor GlcCer, als donor van glucose in transglucosylering reacties gekatalyseerd door β -glucosidasen. Vervolg-onderzoek naar andere geglycosyleerde metaboliëten die gevormd worden door vergelijkbare transglucosyleringsreacties is noodzakelijk.

Hoofdstuk 15 beschrijft een opmerkelijke additionele activiteit van GBA1. Er wordt aangetoond dat GBA1 in staat is om ook fluorogene β -xylosides te splitsen en de xylose groepen over te dragen naar cholesterol. Deze GBA1 gekatalyseerde 'transxylosylatie' van cholesterol produceert monoxylosyl-cholesterol (XylChol) en zelfs di- en tri-xylosyl-cholesterol (Xyl₂Chol en Xyl₃Chol). Nieuw gevormd Xyl-Chol blijkt slecht te worden afgebroken door GBA1 en uitstekend dienst te doen als acceptor voor verdere aanhechting van xyloses, dit in tegenstelling tot GlcChol. Het genereren van xylosyl-cholesterol vindt ook plaats in intacte cellen bij hun blootstelling aan 4-methylumbelliferyl- β -D-xylose en kan worden geremd door specifieke remmers van GBA1. Ophoping van cholesterol in lysosomen, geïnduceerd met U18666A, vergroot de vorming van gexylosyleerde cholesterol moleculen aanzienlijk. Van de twee andere cellulaire β -glucosidasen, GBA2 en GBA3, blijkt slechts GBA3 β -xylosidase en transxylosylase activiteit te vertonen. Toekomstig onderzoek zal zich moeten richten op de fysiologische relevantie van de waargenomen transxylosylering. In het bijzonder zal met UPLC-ESI-MS/MS de aanwezigheid van Xyl-Chol en mogelijk andere ge-xylosyleerde lipiden bestudeerd moeten worden.

Addendum I is een publicatie betreffende de synthese van glycosphingolipiden bevattend ¹³C-atomen hetzij in het sphingosine of palmitaat deel, of beiden [5]. Deze lipiden zijn van grote waarde als interne standaarden voor accurate kwantificatie van overeenkomstige natuurlijke GSLs in complexe biologische materialen zoals urine, plasma en lysaten van cellen en weefsels. Ze kunnen bovendien worden gebruikt bij onderzoek aan *in vivo* metabolisme van lipiden (zie hoofdstuk 12 voor een voorbeeld).

Addendum II bevat een reeks publicaties waarin het praktische gebruik van lipide-analyses in de kliniek wordt beschreven [1-4]. Een korte samenvatting hiervan wordt gepresenteerd in hoofdstuk 9.

Addendum III is een publicatie waarin de kwalijke adaptatie door het niet-lysosomale GBA2 op een verminderde activiteit van lysosomaal GBA1 in muizen met de NPC ziekte wordt aangetoond [6]. Bescherming tegen motor neuron verlies in de muizen kan verkregen worden door genetische vermindering van GBA2 als ook specifieke remming van enzym activiteit.

Referenties:

- 1 Rombach SM, Aerts JM, Poorthuis BJ, Groener JE, Donker-Koopman W, Hendriks E, Mirzaian M, Kuiper S, Wijburg FA, Hollak CE, Linthorst GE. Long-term effect of antibodies against infused alpha-galactosidase A in Fabry disease on plasma and urinary (lyso)Gb3 reduction and treatment outcome. *PLoS One*. 2012;7(10):e47805.
- 2 Smid BE, Rombach SM, Aerts JM, Kuiper S, Mirzaian M, Overkleeft HS, Poorthuis BJ, Hollak CE, Groener JE, Linthorst GE. Consequences of a global enzyme shortage of agalsidase beta in adult Dutch Fabry patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2011 Oct 31;6:69.
- 3 Smid BE, Ferraz MJ, Verhoek M, Mirzaian M, Wisse P, Overkleeft HS, Hollak CE, Aerts JM. Biochemical response to substrate reduction therapy versus enzyme replacement therapy in Gaucher disease type 1 patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2016 Mar 24;11:28.
- 4 Dahl M, Doyle A, Olsson K, Månsson JE, Marques AR, Mirzaian M, Aerts JM, Ehinger M, Rothe M, Modlich U, Schambach A, Karlsson S. Lentiviral gene therapy using cellular promoters cures type 1 Gaucher disease in mice. *Mol Ther*. 2015 May;23(5):835-44.
- 5 Wisse, P., Gold, H., Mirzaian, M., Ferraz, M.J., Lutteke, G., Van Den Berg, R.J.B.H.N., Van Den Elst, H., Lugtenburg, J., Van Der Marel, G.A., Aerts, J.M.F.G., Codée, J.D.C., Overkleeft, H.S. Synthesis of a panel of carbon-13-labelled (glyco)sphingolipids (2015) *European Journal of Organic Chemistry*, 2015 (12), pp. 2661-2677.
- 6 Marques AR, Aten J, Ottenhoff R, van Roomen CP, Herrera Moro D, Claessen N, Vinueza Veloz MF, Zhou K, Lin Z, Mirzaian M, Boot RG, De Zeeuw CI, Overkleeft HS, Yildiz Y, Aerts JM. Reducing GBA2 Activity Ameliorates Neuropathology in Niemann-Pick Type C Mice. *PLoS One*. 2015 Aug 14;10(8):e0135889.

List of publications

Mirzaian M, Wisse P, Ferraz MJ, Marques AR, Gaspar P, Oussoren SV, Kytidou K, Codée JD, van der Marel G, Overkleeft HS, Aerts JM. Simultaneous quantitation of sphingoid bases by UPLC-ESI-MS/MS with identical ¹³C-encoded internal standards. *Clin Chim Acta*. 2017 Jan 13;466:178-184.

Markmann S, Krambeck S, Hughes CJ, **Mirzaian M**, Aerts JM, Saftig P, Schweizer M, Vissers JC, Braulke T, Damme M. Quantitative proteome analysis of mouse liver lysosomes provides evidence for mannose 6-phosphate-independent targeting mechanisms of acid hydrolases in mucopolidosis II. *Mol Cell Proteomics*. 2017 Jan 6. [Epub ahead of print]

Mirzaian M, Wisse P, Ferraz MJ, Marques AR, Gabriel TL, van Roomen CP, Ottenhoff R, van Eijk M, Codée JD, van der Marel GA, Overkleeft HS, Aerts JM. Accurate quantification of sphingosine-1-phosphate in normal and Fabry disease plasma, cells and tissues by LC-MS/MS with ¹³C-encoded natural S1P as internal standard. *Clin Chim Acta*. 2016 May 21;459:36-44.

Marques AR*, **Mirzaian M***, Akiyama H*, Wisse P, Ferraz MJ, Gaspar P, Ghauharali-van der Vlugt K, Meijer R, Giraldo P, Alfonso P, Irún P, Dahl M, Karlsson S, Pavlova EV, Cox TM, Scheij S, Verhoek M, Ottenhoff R, van Roomen CP, Pannu NS, van Eijk M, Dekker N, Boot RG, Overkleeft HS, Blommaart E, Hirabayashi Y, Aerts JM. Glucosylated cholesterol in mammalian cells and tissues: formation and degradation by multiple cellular β -glucosidases. *J Lipid Res*. 2016 Mar;57(3):451-63.

Smid BE*, Ferraz MJ*, Verhoek M, **Mirzaian M**, Wisse P, Overkleeft HS, Hollak CE, Aerts JM. Biochemical response to substrate reduction therapy versus enzyme replacement therapy in Gaucher disease type 1 patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2016 Mar 24;11:28.

Ferraz MJ, Marques AR, Appelman MD, Verhoek M, Strijland A, **Mirzaian M**, Scheij S, Ouairy CM, Lahav D, Wisse P, Overkleeft HS, Boot RG, Aerts JM. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. *FEBS Lett*. 2016 Mar;590(6):716-25.

Ferraz MJ*, Marques AR*, Gaspar P*, **Mirzaian M***, van Roomen C, Ottenhoff R, Alfonso P, Irún P4, Giraldo P, Wisse P, Sá Miranda C, Overkleeft HS, Aerts JM. Lyso-glycosphingolipid abnormalities in different murine models of lysosomal storage disorders. *Mol Genet Metab*. 2016 Feb;117(2):186-93.

Marques AR, Aten J, Ottenhoff R, van Roomen CP, Herrera Moro D, Claessen N, Vinueza Veloz MF, Zhou K, Lin Z, **Mirzaian M**, Boot RG, De Zeeuw CI, Overkleeft HS, Yildiz Y, Aerts JM. Reducing GBA2 Activity Ameliorates Neuropathology in Niemann-Pick Type C Mice. *PLoS One*. 2015 Aug 14;10(8):e0135889.

Dahl M, Doyle A, Olsson K, Månsson JE, Marques AR, **Mirzaian M**, Aerts JM, Ehinger M, Rothe M, Modlich U, Schambach A, Karlsson S. Lentiviral gene therapy using cellular promoters cures type 1 Gaucher disease in mice. *Mol Ther*. 2015 May;23(5):835-44.

Wisse P, Gold H, **Mirzaian M**, Ferraz MJ, Lutteke G, van den Berg RJBHN, van den Elst H, Lugtenburg J, van der Marel GA, Aerts JMFG, Codée JDC, Overkleeft HS. Synthesis of a Panel of Carbon-13-Labelled (Glyco)Sphingolipids. *Eur. J. Org. Chem*. 2015 Apr;12:2661-2677.

Mirzaian M, Kramer G, Poorthuis BJ. Quantification of sulfatides and lysosulfatides in tissues and body fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2015 Apr;56(4):936-43.

Mirzaian M, Wisse P, Ferraz MJ, Gold H, Donker-Koopman WE, Verhoek M, Overkleeft HS, Boot RG, Kramer G, Dekker N, Aerts JM. Mass spectrometric quantification of glucosylsphingosine in plasma and urine of type 1 Gaucher patients using an isotope standard. *Blood Cells Mol Dis.* 2015 Apr;54(4):307-14.

Ferraz MJ, Kallemeijn WW, **Mirzaian M**, Herrera Moro D, Marques A, Wisse P, Boot RG, Willems LI, Overkleeft HS, Aerts JM. Gaucher disease and Fabry disease: new markers and insights in pathophysiology for two distinct glycosphingolipidoses. *Biochim Biophys Acta.* 2014 May;1841(5):811-25.

Gold H*, **Mirzaian M***, Dekker N, Joao Ferraz M, Lugtenburg J, Codée JD, van der Marel GA, Overkleeft HS, Linthorst GE, Groener JE, Aerts JM, Poorthuis BJ. Quantification of globotriaosylsphingosine in plasma and urine of fabry patients by stable isotope ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2013 Mar;59(3):547-56.

Rombach SM, Aerts JM, Poorthuis BJ, Groener JE, Donker-Koopman W, Hendriks E, **Mirzaian M**, Kuiper S, Wijburg FA, Hollak CE, Linthorst GE. Long-term effect of antibodies against infused alpha-galactosidase A in Fabry disease on plasma and urinary (lyso)Gb3 reduction and treatment outcome. *PLoS One.* 2012;7(10):e47805.

Smid BE, Rombach SM, Aerts JM, Kuiper S, **Mirzaian M**, Overkleeft HS, Poorthuis BJ, Hollak CE, Groener JE, Linthorst GE. Consequences of a global enzyme shortage of agalsidase beta in adult Dutch Fabry patients. *Orphanet J Rare Dis.* 2011 Oct 31;6:69.

Groener JE, Serlie MJ, Poppema A, **Mirzaian M**, Aerts JM. Ceramide in lipid emulsions used in parenteral nutrition: an innocent bystander? *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2011 Mar;35(2):270-1.

Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, van Roomen C, **Mirzaian M**, Wijburg FA, Linthorst GE, Vedder AC, Rombach SM, Cox-Brinkman J, Somerharju P, Boot RG, Hollak CE, Brady RO, Poorthuis BJ. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 26;105(8):2812-7.

* *Contributed equally to the work, and should be considered as first authors.*

Curriculum Vitae

Mina Mirzaian was born in Sari (Iran) on 18th July 1963. She obtained her high school diploma (Diplom-Motevaseth, Experimental Sciences) in 1981 in Iran. Mirzaian came to the Netherlands in October 1988 as a political refugee. In 1992 she started with the 'Middelbaar Laboratorium Onderwijs' study (Chemistry track) in Amsterdam and attained her diploma in 1996. After finishing the study she worked in different laboratories at, among others, Food Safety and Quality Inspection Service (Keuringsdienst van Waren) Amsterdam, Municipality Water Supply Department (Gemeentewaterleidingen) Amsterdam, Radionuclide Laboratory at the Academic Medical Center (AMC) Amsterdam, and Pharmaceutical and Clinical Toxicological Laboratory (Laboratory of Pharmacy) at AMC.

In 2004 she started with the part-time bachelor study Chemistry (Analytical Chemistry track) at the University of Applied Science Utrecht, which she completed in 2007. In the same year she started working for the research group of professor Hans Aerts at the Department of Medical Biochemistry AMC. At the same time she started with the part-time Research Master programme Chemistry (Analytical Sciences track) at the University of Amsterdam, which she completed in 2011.

During working at the Aerts group she further specialised in the role of (glyco)sphingolipids in several inherited diseases, among others, Fabry and Gaucher. Mirzaian continued her work with professor Aerts at the Leiden University (Medical Biochemistry department) in 2015 on the 'fundamental and translational medical biochemistry' research project.

PhD investigations supervised by professor Hans Aerts were started in February 2013 at the Academic Medical Center of the University of Amsterdam and were continued from February 2015 onwards at the Leiden Institute of Chemistry of Leiden University. In this research she focussed on new developments and insights of analytical chemistry and biochemistry of glycosphingolipids.

Acknowledgements

I would like to acknowledge all my colleagues at the Department of Medical Biochemistry and Department of Bio-organic Synthesis of Leiden University, at the Department of Medical Biochemistry of the Academic Medical Center Amsterdam, and co-authors that have contributed to the studies presented in this thesis, especially Patrick Wisse, Maria J. Ferraz and André Marques.

Specifically, I would like to thank my promotor, professor Hans Aerts. Dear Hans, thanks for giving me the opportunity to work with you and to do research in your group making this thesis possible. It is very special and inspiring to work with someone like you. Your enthusiasm and perseverance in the field of science makes me think of an ancient Persian poem:

*We live to see that we do not calm
We are a wave that tranquility is our non-existence*

I like to thank my co-promotor, professor Jaap Brouwer, who made it possible for me to complete this thesis in his department. I also would like to thank professor Hermen Overkleef, the collaboration with his department contributed significantly to my thesis. I greatly acknowledge Dr. Ben Poorthuis, the supervisor of my Master thesis, who gave me many insights into biochemistry and inspired me to combine these with analytical chemistry.

I would like to thank both my parents. Particularly my late mother for all her hard work and who was always available for all her eight children, which was a very heavy task especially as my father passed away when I was six years old. Thanks to all my siblings, especially I would like to commemorate my brother Siroos whose life was taken away by the Islamic government of Iran in 1988 because he stuck to his principles and values (as happened to thousands of other political prisoners during 'the black summer of 1988'); I think of you every day. I would like to thank my son Kaveh. Born in 1988 you were then the only light of my life and for 28 years now I'm proud to be your mother. My husband, dear Vincent, we have been through a lot since we've met each other 16 years ago. We stimulated each other to develop intellectually. You finished your PhD in human science when I finished my Master in natural science, now my PhD is completed what will be our next challenge? Probably something like 'human natural science'.

*Mina Mirzaian
Amsterdam
26 February 2017*