

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/55842> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Oussoren, Saskia

**Title:** Chemical biology of glucosylceramide metabolism : fundamental studies and applications for Gaucher disease

**Date:** 2017-09-28

# Appendices

Dutch Summary  
List of Publications  
Curriculum Vitae  
Acknowledgements

## Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft biochemisch onderzoek aan  $\beta$ -glucocerebrosidase (GBA), de lysosomale  $\beta$ -glucosidase die deficiënt is in de ziekte van Gaucher. Factoren die de intralysosomale stabiliteit en half waarde tijd van GBA beïnvloeden vormen een centraal thema in dit proefschrift. De uitgevoerde studies zijn ontworpen om meer inzicht te verkrijgen in de omzetting van GBA moleculen in lysosomen. Deel van het onderzoek maakt gebruik van nieuw ontwikkeld chemisch biologisch gereedschap zoals activiteit gebaseerde probes (ABPs) en foto activeerbare en klik bare (PAC) lipiden.

**Hoofdstuk 1** beschrijft de rol van lysosomale cathepsines in de afbraak van GBA. Meer gedetailleerde kennis over cathepsines in de ziekte van Gaucher is relevant omdat het inzicht kan bieden in de omzetting van GBA in pathologische condities en een nieuwe gelegenheid kan bieden voor therapie, waarin remming van specifieke cathepsines lysosomale GBA niveaus kan verhogen door vermindering van de intralysosomale omzetting. Het is bekend dat het enzym in lysosomen wordt afgebroken door cathepsines, zoals aangetoond door het stabiliserende effect van leupeptine.

Het uitgevoerde onderzoek toonde aan dat ook E64d en de daarvan afgeleide ABP DCG-04, lysosomaal GBA beschermen tegen proteolytische afbraak in normale en Gaucher patiënt fibroblasten en lymfoblasten, zoals aangetoond met behulp van enzymatische activiteitsassays en labeling van actief GBA met ABPs. Blootstelling van gekweekte Gaucher lymfoblasten aan E64d leidde tot een vermindering van glucosylsfiningosine (de base gevormd van stapelend GlcCer), wat een functionele correctie van GBA capaciteit aantoont. De kandidaat proteases betrokken in lysosomale GBA afbraak waren terug gebracht tot cathepsines B, F en L. Echter, individuele vermindering van deze cathepsines door shRNA of CRISPR-Cas technologie was onvoldoende om significant de GBA omzetting in gekweekte cellen te verlagen. Blijkbaar zijn meerdere cathepsines in staat om GBA af te breken in lysosomen en moeten deze tegelijkertijd worden geremd om lysosomaal GBA te verhogen. Een dergelijke benadering is niet aantrekkelijk als therapie vanwege de te verwachten nevenwerkingen.

**Hoofdstuk 2** behandelt de consequenties van bezetting van de katalytische holte van GBA op zijn structurele stabiliteit *in vitro* en *in vivo*. Glycomimetica worden tegenwoordig ontworpen als chemische chaperonnes om de vouwing en stabilisatie van GBA in Gaucher patiënten te promoten, maar bewijs voor *in vivo* efficiëntie van deze benadering is schaars.

De uitgevoerde studie maakte gebruik van amfifiele cyclophellitol-afgeleide ABPs die irreversibel aan de katalytische nucleofiel E340 binden. De potente reversibele remmer isofagomine, een voormalig kandidaat therapeutische chaperonne voor GBA, werd gebruikt ter vergelijking. Cyclophellitol ABPs verhoogden zeer aanzienlijk de stabiliteit van recombinant GBA *in vitro*, zoals aangetoond met thermodynamische metingen en relatieve

resistentie tegen tryptische digestie. Het stabiliserende effect van isofagomine op structurele stabiliteit van puur GBA was minder sterk. Stabilisatie van GBA door cel doordringbare ABP in gekweekte normale en Gaucher patiënt cellen was weerspiegeld door de duidelijke toename in enzym. GBA in lever van wild type muizen geïnfundeerd met ABP was ook gestabiliseerd. Concluderend, bezetting van de holte van GBA door amfifiele ABPs stabiliseert het enzym aanzienlijk. Deze bevinding ondersteunt het concept van reversibele chaperonnes van GBA als therapeutische middelen voor Gaucher.

**Hoofdstuk 3** richt zich op de studie van GBA met chemisch biologische tools: pacGlcCer en fluorescente  $\beta$ -glucose geconfigureerde cyclophellitols die de katalytische E340 residu binden op mechanisme gebaseerde wijze. Structuur-functie relaties in GBA zijn tot dusver bestudeerd met conventionele enzymologie en kristallografie en relatief weinig kennis bestaat over de aglycon bindende eenheid in GBA.

De gepresenteerde studie beschrijft dat de foto-activeerbare (diazirine gefunctionaliseerde) en klikbare (alkyne bevattende) pacGlcCer met hoge affiniteit bindt aan de katalytische holte van actief GBA, het pH optimum van enzymatische activiteit volgend. GBA hydrolyseert pacGlcCer, wat verder de mogelijkheid tot het ingaan van de katalytische holte bevestigt. De binding van pacGlcCer aan GBA is compleet gecompeteerd door de reversibele remmer AMP-DNM en de irreversibele remmers conditurool  $\beta$ -epoxide, cyclophellitol en de afgeleide ABP met fluorofoor label. De labeling van GBA door pacGlcCer wordt ook gecompeteerd door de substraten glucosylsphingosine, GlcChol en 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -glucose. Cholesterol, een acceptor in de transglucosylatie reactie van GBA, remt ook sterk de binding van pacGlcCer, maar niet die van ABP. De bevindingen geven aan dat specifieke labeling van GBA door pacGlcCer via zijn katalytische holte mogelijk is. Het kan worden voorgesteld dat pacGlcCer en ABP labeling van GBA gebruikt kunnen worden in screens om kleine interacterende stoffen te identificeren. Concluderend bieden de beschikbare tools nieuwe mogelijkheden om de glycon- en aglycon-bindingsplekken van de katalytische holte van GBA te proben.

**Hoofdstuk 4** rapporteert de interactie van het lysosomale membraan eiwit LIMP-2 met GBA. De ziekte van Gaucher wordt veroorzaakt door mutaties in GBA zelf, terwijl Actie Myoclonus Renaal Falen (AMRF) komt door mutaties in LIMP-2, het eiwit dat transport van nieuw gevormd GBA naar lysosomen verzorgt. De deficiëntie in LIMP-2 resulteert in verkeerde secretie van GBA in de meeste celtypes. Intrigerend genoeg, ontwikkelen AMRF patiënten niet de karakteristieke glucosylceramide (GlcCer) geladen macrofagen (Gaucher cellen), die een kenmerk zijn van de ziekte van Gaucher. Macrofaag gerichte GBA met terminale mannose residuen in zijn N-glycanen wordt succesvol gebruikt in enzym vervangingstherapie (ERT) van Gaucher, maar voor AMRF is op dit moment geen behandeling beschikbaar.

Het uitgevoerde onderzoek bestudeerde de suppletie van LIMP-2 deficiënte cellen met therapeutisch mannose getermineerde GBA. Studies werden uitgevoerd met zowel

normale en AMRF fibroblasten, als met LIMP-2 deficiënte HEK293 cellen getransduceerd met mannose receptor. In LIMP-2 deficiënte cellen wordt het geëndocyteerde enzym abnormaal snel afgebroken in lysosomen. Dit suggereert dat kortstondige interacties van GBA met LIMP-2 in het lysosoom de conformatie van het enzym stabiliseren en de proteolytische afbraak vertragen. Het geeft verder aan dat LIMP-2 in lysosomen de efficiënte bepaalt van suppletie van deze organellen met ERT. Samenvattend heeft de studie onthuld dat LIMP-2 een duale rol vervult in de levenscyclus van GBA, zowel als transporteur en als intralysosomale chaperonne.

**Hoofdstuk 5** betreft de fundamenteel verschillende klinische manifestatie van Gaucher en AMRF, twee geërfde ziektes waarin GBA verminderd is. In Gaucher is GBA gemuteerd, terwijl in AMRF het normale enzym onjuist uitgescheiden wordt, in plaats van naar lysosomen te worden getransporteerd. De cellulaire en chemische basis voor de verschillende symptomatologie van Gaucher en AMRF werd onderzocht met behulp van een LIMP-2 deficiënt muis model.

De studie richtte zich eerst op de mogelijkheid dat LIMP-2 deficiëntie niet alleen GBA beïnvloedt, maar ook andere lysosomale eiwitten. Geen abnormaliteiten werden gevonden in lysosomale matrix eiwitten in lysosomen geïsoleerd uit lever van LIMP-2 deficiënte muizen, behalve in GBA. Vervolgens werden LIMP-2 deficiënte muizen onderzocht wat betreft rest GBA en lipide abnormaliteiten in verschillende weefsels. Een variabele deficiëntie van GBA tussen weefsels werd opgemerkt, zowel met behulp van enzymatische activiteitsassays als met labeling van actief enzym met ABP. Een hoge rest GBA werd gedetecteerd in leukocyten van LIMP-2 deficiënte muizen, de afwezigheid van macrofaag gerelateerde symptomen in AMRF patiënten verklarend. Bewijs werd verkregen voor endocytotische heropname van GBA door witte bloedcellen, in tegenstelling tot fibroblasten. Lipide analyse toonde aan dat GlcCer nauwelijks verhoogd is in weefsels van LIMP-2 deficiënte muizen en dat de niveaus slecht correleren met rest GBA. In tegenstelling, glucosylsphingosine en geglucosyleerd cholesterol zijn verhoogd en hun niveaus in weefsel correleren negatief met GBA niveaus. Glucosylsphingosine en geglucosyleerd cholesterol waren ook toegenomen in geïsoleerde lysosomen van LIMP-2 deficiënte lever. Concluderend, resulteert LIMP-2 deficiëntie in celtype specifieke vermindering van GBA en adaptieve veranderingen in glycosfingolipide metabolisme.

**Hoofdstuk 6** bespreekt het bewijs voor metabole adaptaties in twee glycosfingolipidoses, de ziekte van Gaucher en Fabry, veroorzaakt door defecten in respectievelijk GBA dat GlcCer afbreekt en  $\alpha$ -galactosidase A (GLA) dat globotriaosylceramide (Gb3) afbreekt. De opeenhoping van de primaire stapelingslipiden in cellen en weefsels van Gaucher en Fabry patiënten neigt te nivelleren met toename van leeftijd, suggererend dat er metabole adaptaties worden geïnduceerd. Een belangrijke adaptatie in zowel Gaucher als Fabry is de actieve de-acetylatie van stapelende glycosfingolipiden in lysosomen door de actie van het enzym zure ceramidase. Dus, de

lysosomale lipiden opslag wordt gelimiteerd door vorming van glucosylsphingosine in Gaucher en globotriaosylsphingosine (lysoGb3) in Fabry. Excessieve GlcSph en lysoGb3 worden gezien als toxisch en dragen bij aan specifieke symptomen zoals multipele myelome in Gaucher patiënten en neuronopathische pijn en nierfalen in Fabry. Een andere aanpassing in metabolisme van Gaucher vindt plaats buiten het lysosoom en betreft het enzym GBA2 dat gelokaliseerd is in het cytoplasmische blad van membranen van het ER en Golgi apparaat. GBA2 maakt degradatie van GlcCer buiten lysosomen mogelijk en genereert daarmee ceramide en geglucosyleerd cholesterol. Therapeutische benadering specifiek gericht op de toxiciteit veroorzaakt door metabole adaptaties in Gaucher en Fabry wordt besproken.

**Hoofdstuk 7** gaat over de katalytische veelzijdigheid van GBA, een  $\beta$ -glucosidase waarvan tot recent gedacht werd dat deze alleen GlcCer tot ceramide en glucose knipt in lysosomen. Speciale aandacht wordt besteed aan transglucosylatie gekatalyseerd door GBA en zijn specificiteit voor de glycon eenheid van een substraat.

GBA staat erom bekend  $\beta$ -glucoside substraten te hydrolyseren en meer recentelijk ook cholesterol te transglucosyleren naar cholesterol- $\beta$ -glucoside (GlcChol). De beschreven studie richtte zich op de mogelijkheid van GBA om  $\beta$ -xylosides te metaboliseren. Er wordt eerst aangetoond dat GBA ook 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylose (4MU- $\beta$ -Xyl) *in vitro* knipt, gestimuleerd in deze activiteit door activator eiwit saposine C. Vervolgens wordt aangetoond dat GBA *in vitro* cholesterol transxylosyleerd, gebruikmakend van 4MU- $\beta$ -Xyl als suiker donor. Gevormd xylosyl-cholesterol (XylChol) dient vervolgens als acceptor om di-xylosyl-cholesterol te verkrijgen. Sequentiële blootstelling van GBA en cholesterol aan 4MU- $\beta$ -Xyl and 4MU- $\beta$ -Glc resulteert in vorming van GlcXylChol. Gelijk aan GBA, toont de cytosolische  $\beta$ -glucosidase GBA3 *in vitro*  $\beta$ -xylosidase en transxylosylase activiteit, in tegenstelling tot GBA2 dat activiteit tegen  $\beta$ -xylosides mist. Gekweekte cellen genereren ook gexylosyleerde cholesterol wanneer blootgesteld aan 4MU- $\beta$ -Xyl in hun medium. Deze synthetische reactie wordt versterkt door de stof U18666A, die een toename van lysosomaal cholesterol veroorzaakt. Voorafgaande inactivatie van GBA in cellen met conditurool  $\beta$ -epoxide voorkomt vorming van gexylosyleerde cholesterol. Samenvattend, is verdere katalytische veelzijdigheid van GBA onthuld: het enzym kan optreden als  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase, transglucosylase en transxylosylase. De fysiologische relevantie van het vermaarde vermogen van GBA om  $\beta$ -xylosides te metaboliseren is momenteel onduidelijk en waarborgt verder onderzoek.

De **Discussie** bespreekt de huidige inzichten in GBA in gezondheid en ziekte. In dit verband worden de moleculaire basis en klinische manifestatie van Gaucher en AMRF syndroom besproken, inclusief de metabole adaptaties aan GBA deficiëntie.

Bijzondere aandacht wordt besteed aan de lysosomale structurele stabiliteit van GBA en geassocieerde resistentie tegen proteolytische degradatie door cysteïne cathepsines. Bevindingen uit literatuur en nieuwe eigen resultaten over dit onderwerp worden besproken. Nieuwe technologie om GBA te bestuderen met labeling door GlcCer en cyclophellitol afgeleide probes wordt geïntroduceerd en de applicatie wordt beschreven.

Onopgeloste onderzoeksvragen over GBA en gerelateerde ziekteomstandigheden worden geïdentificeerd. Als toekomstige onderzoeksdoelstelling wordt de translatie van fundamentele kennis over GBA voor effectieve therapie van neuronopathische Gaucher en andere ziekteomstandigheden veroorzaakt door enzym vermindering besproken.

Het **Addendum** beschrijft een nieuw ontwikkelde multiplex assay voor gelijktijdige kwantificatie van (lyso)-glycosfingolipide basen in plasma monsters door middel van UPLC-ESI-MS/MS met identieke <sup>13</sup>C-gecodeerde interne standaarden. Glycosfingolipiden in hetzelfde plasma monster kunnen ook worden gekwantificeerd na magnetron-geassisteerde de-acetylactie tot glycosfingolipide basen.

## List of Publications

1. 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 (13)C-encoded internal standards*. Clin Chim Acta. 2017 Mar;466:178-184. doi: 10.1016/j.cca.2017.01.014. Epub 2017 Jan 13. PubMed PMID: 28089753.
2. van Weeghel M, Ofman R, Argmann CA, Ruiters JP, Claessen N, Oussoren SV, Wanders RJ, Aten J, Houten SM. *Identification and characterization of Eci3, a murine kidney-specific  $\Delta^3,\Delta^2$ -enoyl-CoA isomerase*. FASEB J. 2014 Mar;28(3):1365-74. doi: 10.1096/fj.13-240416. Epub 2013 Dec 16. PubMed PMID: 24344334.
3. Saskia V. Oussoren, S. Hoogendoorn, M. Verdoes, S. Scheij, M. Verhoek, M. Artola, R.G. Boot, H.S. Overkleeft, J.M.F.G. Aerts. *Augmentation of lysosomal glucocerebrosidase by the inhibition of its lysosomal proteolysis*. Manuscript in preparation.
4. Wouter W. Kallemeijn\*, Fredj Ben Bdira\*, Saskia V. Oussoren, Saskia Scheij, Boris Bleijlevens, Cindy P. A. A. van Roomen, Roelof Ottenhoff, Marielle J. F. M. van Kooten, Marthe T. C. Walvoort, Martin D. Witte, Rolf G. Boot, Marcellus Ubbink, Herman S. Overkleeft, Johannes M. F. G. Aerts. *Stabilization of glucocerebrosidase by active-site occupancy*. Manuscript submitted.
5. Saskia V. Oussoren, Jasper Wermink, Jianbing Jang, Herman S. Overkleeft, Johannes M. Aerts, Per Haberkant. *Chemical probing of the catalytic pocket of glucocerebrosidase with photoactivatable glucosylceramide and activity-based probes*. Manuscript in preparation.
6. Paulo Gaspar, Saskia V. Oussoren, Saskia Scheij, Marri Verhoek, Rolf Boot, Herman S. Overkleeft, Jan Aten, Johannes M. Aerts. *Intralysosomal stabilization of glucocerebrosidase by LIMP-2: potential implications for efficacy of ERT*. Manuscript in preparation.
7. Paulo Gaspar, Maria J. Ferraz, Markus Damme, André R. A. Marques, Saskia V. Oussoren, GertJan Kramer, Mina Mirzaian, Marion Gijbels, Roelof Ottenhoff, Cindy van Roomen, Wilma E. Donker-Koopman, Michael Schwake, Saskia Heybrock, Kondababu Kurakula, Maria Carmo Macário, Clara Sá Miranda, Paul Saftig, Johannes M. Aerts. *Lipid abnormalities in LIMP-2 deficient mice*. Manuscript pending submission.
8. Johannes M. Aerts, Maria J. Ferraz, Mina Mirzaian, Saskia V. Oussoren, Kassiani Kytidou, Ethan Kuo, Lindsey Lelieveld, Marc Hazeu, Daphne Boer, Paulo Gaspar, Daniela Herrera Moro, Tanit L. Gabriel, Wouter W. Kallemeijn, Patrick Wisse, Herman S. Overkleeft, Marco van Eijk, Rolf G. Boot, André R. A. Marques. *Metabolic adaptations to defective lysosomal glycosphingolipid degradation*. Manuscript pending submission.

9. Mina Mirzaian\*, Maria J. Ferraz\*, Daphne E.C. Boer, Saskia V. Ousoren, Marc Hazeu, Jasper Wermink, Per Haberkant, Sybrin P. Schroder, Karen Ghauharali, Edward Blommaart, Roelof Ottenhoff, Andre R.A. Marques, Rianne Meijer, Wouter Kallemeijn, Rolf G. Boot, Herman S. Overkleeft, Navraj S. Pannu, Johannes M. Aerts.  *$\beta$ -Xylosidase and transxylosidase activities of human glucocerebrosidase*. Manuscript pending submission.

## Curriculum Vitae

Saskia Oussoren was born on October 8th in Koog aan de Zaan, The Netherlands. After graduating from St. Michaël College high school in Zaandam in 2007, she started her Bachelor of Science studies at the University of Amsterdam with Neurobiology, Nutrition and Anatomy and Developmental Biology as elective courses. The thesis of her research stay at the Laboratory of Genetic Metabolic Diseases in the Academic Medical Center (AMC) in Amsterdam was titled "A localization study of  $\Delta 3$ ,  $\Delta 2$ -enoyl-CoA isomerases". In 2010 she completed her Bachelor degree.

She next also performed her Master of Science studies at the University of Amsterdam and followed the courses Molecular biology of the cell, Medical Molecular Systems Biology, Endocrinology and Medical Bio-Chemistry. During her Master studies she performed a research project in the OLVG hospital in Amsterdam, her report was titled "Disseminated intravascular coagulation (DIC) in critically ill patients. Functional analysis of changes in Microparticle-induced clot formation in vitro of DIC patients". A second research stay was fulfilled at the Department of Medical Biochemistry in the AMC in Amsterdam, her report being titled "The role of GBA2 at the cellular level". She wrote her Master thesis on the topic "Nod-like receptors link innate immunity to the metabolic syndrome".

In 2012 she obtained her Master degree and started as a PhD candidate at the Department of Medical Biochemistry in the AMC. Saskia performed her research under the supervision of prof. dr. Hans Aerts, dr. Rolf Boot and, at the beginning, dr. Marco van Eijk. After 2.5 years, she continued her research in the newly created department of Medical Biochemistry at the Leiden Institute of Chemistry (Leiden University, The Netherlands), led by prof. dr. Hans Aerts. During her research, she investigated the role of lysosomal proteases in the breakdown of the lysosomal  $\beta$ -glucocerebrosidase and used chemical probing with photo activatable and clickable lipids and activity based probes to study the glycon and aglycon pockets of the same enzyme. She presented her work at several (inter)national conferences, including the 19<sup>th</sup> Workshop European Study Group on Lysosomal Disorders (ESGLD) in 2013 (Graz, Austria), the FEBS Advanced Lecture Course 360 Degrees Lysosome in 2014 (Kusadasi, Turkey), the ACM/MDL meetings of 2013 and 2014 (Lunteren, The Netherlands) and the ESGLD meeting in 2015 (Pozzuoli, Italy). Furthermore, her abstract titled "Lysosomal cathepsins and glucocerebrosidase in Gaucher disease" was selected for oral presentation at the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD) meeting in Israel in 2014.

## Acknowledgements

I would like to acknowledge all colleagues at the Medical Biochemistry department in Leiden as well as the AMC in Amsterdam. Special thankfulness goes out to my promotor Hans Aerts for giving me the opportunity of performing my PhD in his group and for his enthusiastic guidance and supervision throughout the years. Also to my co-promotor Rolf Boot and former internship supervisor Marco van Eijk: thanks a lot for your help and advice. Saskia Scheij and Marri Verhoek, I am very thankful for your help and could not have come through my PhD without it. Per Haberkant, thank you for our nice collaboration and your help in our joint project. In addition, the colleagues from the Bio-organic Synthesis department in Leiden were of good company and support and contributed to the gezelligheid in the Science Club. Furthermore, the staff in both Leiden and Amsterdam were of great value for providing good working conditions. Finally, I am very thankful for the support of my family and friends throughout the years. Thank you very much for your understanding at times when I was trying to explain the hurdles I came across in “Jip en Janneke taal”.