

Storage solutions

Citation for published version (APA):

Walenbergh, S. M. A. (2016). *Storage solutions: novel ways for the detection and inhibition of non-alcoholic steatohepatitis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20160129sw>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160129sw](https://doi.org/10.26481/dis.20160129sw)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Summary

Chapter 1 provides a general overview regarding the physiological metabolic functions of the liver. Thereafter, NASH is introduced as a liver disease that is often referred to as the hepatic manifestation of the metabolic syndrome. A summary is provided about the epidemiology, the pathogenesis, diagnosis and therapy of NASH. Finally, the thesis aim and outline are described.

In **chapter 2**, the central hypothesis of this thesis is discussed in more details and oxidized cholesterol is proposed as a novel risk factor for the development of NASH. New insights in the mechanisms are given by which oxidized LDL (oxLDL) can trigger NASH. In addition, this chapter discusses the clinical implications of oxLDL from a diagnostic and therapeutic point of view.

In **chapter 3**, we hypothesized that lysosomal trapping of oxLDL in Kupffer cells will lead to hepatic inflammation. To test this hypothesis, *Ldlr*^{-/-} mice were injected with LDL, acLDL and oxLDL. Mice injected with oxLDL, unlike acLDL and LDL, demonstrated increased lysosomal cholesterol accumulation in the Kupffer cells. Next to that, oxLDL-injected mice had increased hepatic inflammation. These findings indicate that trapping of the oxidized form of lipoproteins inside lysosomes of KCs is associated with the development of hepatic inflammation.

In **chapter 4**, we hypothesized that there is a causal relationship between lysosomal cholesterol accumulation inside Kupffer cells and hepatic inflammation. Moreover, we hypothesized that oxLDL is a significant contributor to the hepatic inflammatory response. To test these hypotheses, *Ldlr*^{-/-} mice were depleted from their hematopoietic system and were transplanted with bone marrow from *Npc1*^{mutant} mice. Due to the macrophage-deficient *Npc1* protein, which is a lysosomal cholesterol transporter, these mice develop lysosomal cholesterol accumulation exclusively in the hematopoietic system. After 3 months of HFC feeding, we found that *Npc1*^{mutant}-transplanted mice demonstrated severe hepatic inflammation and fibrosis. Next, we showed that by elevating the anti-oxLDL antibodies, the cholesterol metabolism, lysosomal dysfunction, and hepatic inflammation were improved. We concluded that there is a direct causal link between lysosomal cholesterol accumulation inside Kupffer cells and hepatic inflammation with a specific role for oxLDL.

In **chapter 5**, we hypothesized that an immune response towards oxidized cholesterol will reduce hepatic inflammation during diet-induced NASH. To test this hypothesis, we immunized *Ldlr*^{-/-} mice with heat-inactivated pneumococci. This immunization protocol gives rise to high levels of natural occurring anti-oxLDL antibodies, due to molecular mimicry between epitopes of the *Streptococcus pneumoniae* bacterium and oxLDL. After treating *Ldlr*^{-/-} mice with these heat-inactivated pneumococci, we

demonstrated that hepatic inflammation and plasma cholesterol levels were significantly decreased. To this end, we concluded that pneumococcal immunization could lead to a therapeutic vaccination protocol towards the prevention of NASH.

In **chapter 6**, we hypothesized that plasma cathepsin D, a lysosomal enzyme, correlated with severity of liver inflammation in children with NAFLD. Liver biopsies of ninety-six children were evaluated and classified as having steatosis, borderline NASH and definite NASH. In the plasma of these patients, we have found that cathepsin D levels were significantly lower in subjects with liver inflammation compared to the subjects with borderline NASH or steatosis and reached a high diagnostic accuracy. Moreover, the gradual reduction in plasma cathepsin D corresponded with an increasing severity of liver inflammation, steatosis, hepatocellular ballooning and the NAFLD activity score. We concluded that plasma cathepsin D is a useful and novel diagnostic tool to predict hepatic inflammation in children.

In **chapter 7**, we hypothesized that plasma cathepsin D correlated with progression and regression of NASH in adults. In contrast to our previous observations in childhood NASH, we observed increased levels of plasma cathepsin D in adults with NASH compared to adults without hepatic inflammation. Furthermore, after surgical intervention, we found a significant reduction of plasma cathepsin D levels in adult NASH patients compared to the initial levels before the intervention. We concluded that a distinct pathophysiology exists between NASH in children and adults. The observation that cathepsin D levels correlated with NASH development and regression is promising and points toward implementation of plasma cathepsin D in the clinical follow-up of NASH patients.

In **chapter 8**, the main findings of this thesis are summarized and describe the involvement of lysosomal cholesterol accumulation in driving inflammation in the context of NASH as well as atherosclerosis. In addition, this chapter discusses the challenges in improving cholesterol trafficking in macrophages in order to reduce lysosomal cholesterol accumulation and recent successful research directions.

Finally, in **chapter 9**, the major findings of this thesis were discussed and placed in the current status of this field.

Samenvatting

Samenvatting

Ten eerste werd een algemeen overzicht gegeven in **hoofdstuk 1** met betrekking tot de fysiologische functies van de lever. Daarnaast werd leverontsteking, ofwel NASH, geïntroduceerd als een leveraandoening binnen het spectrum van het metabool syndroom. Ten slotte werd de epidemiologie, pathogenese, diagnose en therapie van NASH kort samengevat.

In **hoofdstuk 2** werd de centrale hypothese van deze thesis in meer detail beschreven en werd geoxideerd cholesterol voorgesteld als een nieuwe risicofactor voor het ontwikkelen van NASH. Nieuwe mechanistische inzichten werden besproken in hoe geoxideerd LDL (oxLDL) NASH kan veroorzaken. Vanuit een diagnostisch en therapeutisch oogpunt werd in dit hoofdstuk ook de klinische implicaties van oxLDL bediscussieerd.

In **hoofdstuk 3** hadden we de hypothese dat lysosomale stapeling van oxLDL in Kupffer cellen leverontsteking veroorzaakt. Om deze hypothese te testen, injecteerden we *Ldlr*^{-/-} muizen met LDL, acLDL en oxLDL. De muizen geïnjecteerd met oxLDL, vertoonden meer lysosomale cholesterol opstapeling in de Kupffer cellen en meer leverontsteking dan in de muizen geïnjecteerd met acLDL en LDL. Deze bevindingen laten een associatie zien tussen lysosomale oxLDL stapeling in de Kupffer cellen en het ontstaan van leverontsteking in *Ldlr*^{-/-} muizen. Het volgende hoofdstuk richtte zich op het oorzakelijk verband tussen de twee.

In **hoofdstuk 4** hypotheerden we dat er een oorzakelijk verband bestaat tussen lysosomale cholesterol stapeling in de Kupffer cellen en leverontsteking. Bovendien, dat oxLDL een belangrijke bijdrage levert aan het ontstekingsproces in de lever.

Ldlr^{-/-} muizen werden van hun hematopoietische systeem ontzien en werden getransplanteerd met beenmerg van *Npc1* mutante muizen. Door de macrofaag-specifieke uitschakeling van het NPC1 eiwit, welke een lysosomale cholesterol transporter is, ontwikkelen deze muizen lysosomale cholesterol stapeling specifiek in de hematopoietische cellen. Na een hoog-vet, hoog-cholesterol dieet van 3 maanden, ontwikkelden deze *Npc1*^{mutant}-getransplanteerde muizen ernstige leverontsteking en fibrose. Echter, door het verhogen van anti-oxLDL antilichamen, verbeterde het cholesterol metabolisme, lysosomale dysfunctie en leverontsteking in deze muizen. Hieruit hebben we geconcludeerd dat er een direct oorzakelijk verband bestaat tussen lysosomale cholesterol stapeling in de Kupffer cellen en leverontsteking, waarbij oxLDL een belangrijke rol speelt.

In **hoofdstuk 5** hypotheerden we dat een immuunrespons tegen oxLDL leverontsteking zou verminderen. Om deze hypothese te testen, hebben we *Ldlr*^{-/-} muizen geïmmuniseerd met hitte-geïnactiveerde pneumococci. Vanwege een

moleculaire gelijkenis tussen de epitopen van de *Streptococcus pneumoniae* bacterie en oxLDL, geeft dit immunisatie protocol een sterke verhoging van natuurlijk voorkomende anti-oxLDL antilichamen. We hebben aangetoond dat zowel leverontsteking als plasma cholesterol waarden sterk gereduceerd waren in *Ldlr*^{-/-} muizen na immunisatie behandeling met deze hitte-geïnactiveerde pneumococci. Hieruit hebben we geconcludeerd dat een vaccinatie met hitte-geïnactiveerde pneumococci kan dienen als preventiemiddel voor het ontstaan van NASH.

In **hoofdstuk 6** hadden we de hypothese dat er een correlatie bestaat tussen plasma cathepsine D, een lysosomaal enzyme, en de mate van leverontsteking in kinderen met NAFLD. Lever biopten van 96 kinderen werden geclassificeerd als zijnde steatose, borderline NASH en definitief NASH. In het plasma van deze patiënten hebben we aangetoond dat cathepsine D significant lager is in NASH patiënten vergeleken met steatose of borderline NASH patiënten. De geleidelijke daling van plasma cathepsine D kwam overeen met een toenemende vorm van leverontsteking, steatose, hepatocellulaire ballooning en NAFLD activiteitsscore. We concludeerden dat plasma cathepsine D een bruikbare en nieuwe diagnostische methode is om leverontsteking in kinderen te voorspellen.

In **hoofdstuk 7** werd de hypothese gesteld dat er een correlatie bestaat tussen plasma cathepsine D en de progressie en regressie van NASH in volwassenen. In tegenstelling tot onze voorgaande observaties in kinderen met NASH, toonden we in 3 complementaire volwassen NASH cohorten aan dat plasma cathepsine D verhoogd is in volwassen NASH patiënten vergeleken met volwassenen zonder NASH. Bovendien vonden we een verlaging van plasma cathepsine D in volwassenen met NASH die een chirurgische interventie ondergingen, vergeleken met de beginwaarden van cathepsine D voor de interventie. Hieruit hebben we geconcludeerd dat een verschillende pathofysiologie ten grondslag ligt aan het ontstaan van NASH in kinderen ten opzichte van het ontstaan van NASH in volwassenen. De observatie dat een correlatie bestaat tussen cathepsine D en NASH progressie en regressie is veelbelovend en wijst naar een implementatie van plasma cathepsine D in de diagnostiek en klinische follow-up van NASH patiënten.

In **hoofdstuk 8** werd de betrokkenheid van lysosomale cholesterol stapeling in macrofagen in het aandrijven van ontsteking in de context van NASH en atherosclerose (aderverkalking) beschreven. Bovendien werden in dit hoofdstuk de uitdagingen besproken die om de hoek komen kijken bij het verbeteren van het cholesterol transport in macrofagen om zodoende lysosomale cholesterol stapeling te verminderen. Tot slot werden in **hoofdstuk 9** de belangrijkste bevindingen van deze thesis geplaatst in de huidige stand van zaken.