

Lysosomes ‘in control’

Citation for published version (APA):

Houben, T. (2018). *Lysosomes ‘in control’: where lipids meet Inflammation in metabolic syndrome*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20180118th>

Document status and date:

Published: 01/01/2018

DOI:

[10.26481/dis.20180118th](https://doi.org/10.26481/dis.20180118th)

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

In **Chapter 1**, the central role of the liver in metabolic syndrome is introduced. After highlighting the clinical challenges of NASH (which is the hepatic manifestation of metabolic syndrome), lysosomal lipid accumulation in macrophages was proposed as a novel mechanism leading to NASH. Furthermore, we explain how this mechanism can be used as a translational platform to tackle the aforementioned clinical challenges. Finally, the content of this thesis is summarized.

Chapter 2 provides information on the central role of oxidized LDL in NASH. There, the biochemical generation of oxidized lipids are explained, and the mechanisms by which these oxidized lipids affect hepatic inflammation are summarized. Finally, the implications of these findings for patients are emphasized.

Chapter 3 describes the interplay between the gut microbiota and the intestinal immune system in the context of metabolic syndrome. An overview of the molecular aspects of the gut microbiota-immune system axis is given, and the influence of the diet on the regulation of this axis is highlighted. Finally, future perspectives for gut microbiota research are suggested.

In **Chapter 4**, we investigate whether lysosomal lipid accumulation in blood-derived hepatic macrophages is a causal trigger for the development of hepatic inflammation. We hypothesize that oxLDL-derived lipids are essential in mediating lysosomal lipid-induced hepatic inflammation. For this purpose, irradiated *Ldlr*^{-/-} mice were transplanted with bone marrow from either Niemann-Pick Type C1 mutant (*Npc1*^{mut}) or wildtype (*Npc1*^{wt}) mice and fed a high-fat, high-cholesterol (HFC) diet for 12 weeks. Due to the hematopoietic deficiency of the gene encoding the NPC1 protein, which is a lysosomal lipid transporter, lipids accumulate in lysosomes of blood-derived hepatic macrophages. As expected, hepatic inflammation and fibrosis were increased in the *Npc1*^{mut} transplanted mice. Accordingly, preventing the uptake of oxLDL by macrophages by increasing circulating anti-oxLDL IgM antibodies reduced hepatic inflammation and hepatic fibrosis. These findings were also confirmed *in vitro*. We conclude that blood-derived macrophages prone to accumulate lysosomal lipids trigger oxLDL-dependent murine steatohepatitis.

In **Chapter 5**, we hypothesize that plasma levels of the lysosomal enzyme cathepsin D correlate with the level of hepatic inflammation in children suffering from fatty liver disease. Liver biopsies of ninety-six children were evaluated and classified as having steatosis, borderline NASH or definite NASH, respectively. We demonstrated that plasma cathepsin D levels were significantly lower in children with definite NASH compared to children with borderline NASH or steatosis. Moreover, a reduction of

plasma cathepsin D levels corresponded with increasing hepatic inflammation, steatosis, hepatocellular ballooning and a higher NAFLD activity score. We conclude that plasma cathepsin D is a novel non-invasive tool to predict pediatric hepatic inflammation.

In **Chapter 6**, we hypothesize that the progression and regression of adult NASH correlates with plasma cathepsin D levels. We observed increased levels of plasma cathepsin D in adults with NASH compared to adults without NASH. Furthermore, after surgical intervention, plasma cathepsin D levels were reduced compared the levels measured before the intervention. We conclude that plasma cathepsin D levels correlate with adult NASH progression and regression, and propose implementation of plasma cathepsin D determination to monitor adult NASH patients.

In **Chapter 7**, we hypothesize that cathepsin D plays an active role in the development of hepatic inflammation during NASH. By injecting *Ldlr*^{-/-} mice with pepstatin A, an inhibitor of aspartyl proteases, we demonstrated that inhibition of cathepsin D reduced hepatic inflammation. Mechanistically, our data suggested that increased fecal excretion of bile acids improved lipid metabolism, resulting in decreased hepatic inflammation. The largest reduction in cathepsin D activity was observed in the circulating fraction, suggesting that circulating cathepsin D contributed most to the observed effects. Collectively, this chapter shows for the first time the role of cathepsin D in the pathogenesis of NASH.

In **Chapter 8**, we hypothesize that a hematopoietic *Npc1* mutation would shift the gut microbiota composition in *Ldlr*^{-/-} mice. Therefore, irradiated *Ldlr*^{-/-} mice were transplanted with bone marrow from either Niemann-Pick Type C1 mutant (*Npc1*^{mut}) or wildtype (*Npc1*^{wt}) mice and fed a high-fat, high-cholesterol (HFC) diet for 12 weeks. Due to the hematopoietic deficiency of the gene encoding the NPC1 protein, which is a lysosomal lipid transporter, lipids accumulate in lysosomes of blood-derived hepatic macrophages. The hematopoietic *Npc1* mutation shifted gut microbiota composition and increased microbial richness and diversity. We conclude that non-dietary changes in lipid metabolism such as a hematopoietic *Npc1* mutation can shift the gut microbiota composition.

Finally, **Chapter 9** discusses the major findings of the thesis, places them in perspective relative to their research field(s) and provides information regarding their value for clinicians.

Samenvatting

Samenvatting

In **hoofdstuk 1** wordt de centrale rol van de lever in het metabool syndroom geïntroduceerd en worden de klinische uitdagingen van NASH, de hepatische manifestatie is van het metabool syndroom, benadrukt. Wij stellen lysosomale lipide stapeling in macrofagen voor als een nieuw, onderliggend mechanisme dat leidt tot NASH. Vervolgens leggen we uit hoe dit mechanisme kan gebruikt worden als translationeel platform om de hiervoor aangehaalde klinische uitdagingen aan te pakken. Ten slotte wordt de inhoud van de thesis samengevat.

Hoofdstuk 2 verstrekt informatie betreffende de centrale rol van geoxideerd LDL in NASH. De biochemische reacties die aan de basis liggen van de vorming van geoxideerde lipiden worden uitgelegd. Daarnaast vat dit hoofdstuk ook samen via welke mechanismen deze geoxideerde lipiden leverontsteking beïnvloeden. Uiteindelijk worden de implicaties van deze bevindingen voor patiënten nog benadrukt.

Hoofdstuk 3 beschrijft de wisselwerking tussen darmbacteriën en het darmgeassocieerde immuun systeem in de context van het metabool syndroom. Naast het geven van een overzicht betreffende de moleculaire aspecten van deze as, wordt de invloed van het dieet op het reguleren van deze as benadrukt. Uiteindelijk worden de toekomstperspectieven van darmbacterie-onderzoek samengevat.

In **hoofdstuk 4** onderzochten we of er een oorzakelijk verband bestaat tussen leverontsteking en lysosomale stapeling van lipiden in levermacrofagen afkomstig van het bloed. We stelden de hypothese dat lipiden afkomstig van oxLDL partikels essentieel zijn voor het mediëren van lysosomale lipiden-geïnduceerde leverontsteking. Hiervoor verwijderden we eerst het aanwezige hematopoietische systeem van *Ldlr*^{-/-} muizen door ze bloot te stellen aan radioactieve straling. Vervolgens ontvingen deze muizen beenmerg afkomstig van Niemann-Pick type C1 mutant of wildtype muizen en kregen ze een hoog-vet, hoog-cholesterol dieet van 12 weken. Door de hematopoietisch-specifieke uitschakeling van het gen dat codeert voor het NPC1 eiwit, stapelen de lipiden zich op in de lysosomen van levermacrofagen afkomstig van het bloed. Zoals we verwachtten, waren leverontsteking alsook leverfibrose verhoogd in *Npc1*^{mut} getransplanteerde muizen. Verder stelden we vast dat het voorkomen van oxLDL-opname in macrofagen door anti-oxLDL IgM antilichamen te verhogen, resulteerde in een daling van leverontsteking en leverfibrose. Deze bevindingen konden wij ook *in vitro* bevestigen. We concluderen dat bloed-afgeleide macrofagen die vatbaar zijn voor de stapeling van lysosomale lipiden een oorzaak zijn voor oxLDL-afhankelijke steatohepatitis in muizen.

In **hoofdstuk 5** stelden we de hypothese dat plasma waarden van het lysosomale enzyme cathepsine D correleren met de hoeveelheid leverontsteking in kinderen, die gediagnosticeerd zijn met vette leverziekte. Leverbiopten van 96 kinderen werden geëvalueerd en geclassificeerd als steatose, borderline NASH of definitief NASH. We toonden aan dat plasma cathepsine D waarden significant lager waren in kinderen met definitieve NASH vergeleken met kinderen met borderline NASH of steatose. Verder kwam de daling van plasma cathepsine D waarden overeen met verhoogde leverontsteking, steatose, hepatocellulair ballooning en de NAFLD activiteitscore. We concludeerden dat plasma cathepsine D een nieuwe niet-invasieve methode is om leverontsteking te voorspellen in kinderen.

In **hoofdstuk 6** stelden we de hypothese dat er een verband bestaat tussen plasma cathepsine D waarden en de ontwikkeling en regressie van NASH in volwassenen. In volwassen NASH patiënten observeerden we verhoogde waarden van plasma cathepsine D vergeleken met volwassenen zonder NASH. Verder stelden we vast dat na een chirurgische ingreep, de plasma cathepsine D waarden daalden t.o.v. de meting uitgevoerd voor de ingreep. We concluderen dat plasma cathepsine D waarden correleren met de ontwikkeling en regressie van NASH in volwassenen. Wij stellen voor om plasma cathepsine D metingen te gebruiken om NASH op te volgen in volwassenen.

In **hoofdstuk 7** stelden we de hypothese dat cathepsine D een actieve rol speelt in de ontwikkeling van NASH. Door *Ldlr*^{-/-} muizen te injecteren met pepstatine A, een inhibitor van aspartyl proteasen, toonden we aan dat het blokkeren van cathepsine D leidde tot een daling van leverontsteking. Mechanistisch gezien, suggereerden onze bevindingen dat door een verhoogde fecale excretie van galzuren, het lipide metabolisme verbeterde waardoor leverontsteking daalde. Omdat het cathepsine D in de circulatie het sterkst werd geblokkeerd, is het waarschijnlijk dat het plasma cathepsine D het meest bijdraagt aan de door ons beschreven effecten. Dit hoofdstuk beschrijft voor de eerste keer de rol van cathepsine D in de ontwikkeling van NASH.

In **hoofdstuk 8** stelden we de hypothese dat een hematopoietische *Npc1* mutatie een verschuiving zou veroorzaken in de samenstelling van de darmbacteriën van *Ldlr*^{-/-} muizen. Hiervoor verwijderden we eerst het aanwezige hematopoietische systeem van *Ldlr*^{-/-} muizen door ze bloot te stellen aan radioactieve straling. Vervolgens ontvingen deze muizen beenmerg afkomstig van Niemann-Pick type C1 mutant of wildtype muizen en kregen ze een hoog-vet, hoog-cholesterol dieet van 12 weken. Door de hematopoietisch-specifieke uitschakeling van het gen dat codeert voor het NPC1 eiwit, stapelen de lipiden zich op in de lysosomen van levermacrofagen afkomstig van het bloed. De hematopoietische *Npc1* mutatie veranderde de samenstelling van de darmbacteriën en verhoogde de microbiële rijkheid en diversiteit. We concluderen dat

niet-dieet gerelateerde veranderingen in het lipide metabolisme, zoals een hematopoietische *Npc1* mutatie, de samenstelling van darmbacteriën kan veranderen.

Tot slot bediscussieert **hoofdstuk 9** de belangrijkste bevindingen van de thesis in het licht van de huidige stand van zaken in de respectievelijke onderzoeksgebieden. Verder wordt de klinische waarde van deze bevindingen besproken.