

**CHARACTERISATION OF THE
MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY
DOMAIN CONTAINING 1 PROTEIN (MFSD1)
AND STUDY OF ITS PHYSIOLOGICAL ROLE IN THE MOUSE**

DISSERTATION

In fulfilment of the requirements for the degree

‘Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)’

submitted to the Faculty of Mathematics and Natural Sciences

at the Christian Albrechts University of Kiel

submitted by

David Massa Lopez

Kiel, July 2018

Referee: Prof. Dr. Paul Saftig

Co-referee: Prof. Dr. Eric Beitz

Date of oral publication: 16.10.2018

Approved for publication:

Summary

The lysosome is a membrane-enclosed organelle specialized in the catabolism of macromolecules in eukaryotic cells. Catabolic products are exported to the cytosol by lysosomal membrane transporters. Some transport systems were already biochemically characterized, but generally only a few genes and proteins coding for the responsible transporters have been identified so far. Additional lysosomal metabolites with higher concentrations than in the cytosol have been described for which the importers are still unknown.

In this study, a recently identified putative lysosomal transporter, Major Facilitator Superfamily Domain containing 1 (MFSD1), was biochemically characterized and its physiological role in mice was investigated.

MFSD1 is expressed ubiquitously in mouse tissues. A dileucine-based lysosomal sorting motif necessary for the transport of MFSD1 to lysosomes was identified. GLMP, a highly glycosylated lysosomal membrane protein, was identified as an interaction partner of MFSD1. The stability of GLMP and MFSD1 depends on each other. In the absence of GLMP, the levels of MFSD1 in tissues and cells were decreased below 10 % of normal levels.

A thorough study of newly generated MFSD1-deficient mice revealed a complex phenotype, pointing towards a critical and essential role of MFSD1 in the physiology of the liver, the bone, the kidney and the immune system. MFSD1-deficient mice suffer from a liver insult characterized by loss of sinusoids, extravasation of erythrocytes, fibrosis and neocapillarization, a pathology that resembles that of human patients suffering from sinusoidal obstructive syndrome (SOS). SOS patients with genetic mutations in the transcription factor sp110 show an immunodeficiency. Interestingly, MFSD1-knockout mice are also immunodeficient due to impaired maturation of B lymphocytes, suggesting a possible role of MFSD1 in the pathology of SOS patients with immunodeficiency. Additionally, the mineralization ability of MFSD1-deficient osteoblasts in vertebrae is impaired, leading to decreased bone mineral density. Furthermore, the absence of MFSD1 also leads to an increase of the size of lysosomes in the proximal tubules of the kidney, suggesting a potential accumulation of the substrate(s) normally transported by MFSD1. A prove of the interdependence between MFSD1 and GLMP is that the phenotype of GLMP-deficient mice is a phenocopy of MFSD1 knockout mice.

Zusammenfassung

Das Lysosom ist ein membranumschlossenes Zellorganell, das auf den Katabolismus von Makromolekülen in eukaryontischen Zellen spezialisiert ist. Die dabei entstehenden Abbauprodukte werden über lysosomale Membrantransporter aus dem Lysosom in das Zytosol der Zelle exportiert. Einige wenige dieser Transportproteine wurden bereits biochemisch charakterisiert, wohingegen bisher nur wenige Gene identifiziert wurden, welche für diese verantwortlichen Membrantransporter codieren. Zudem wurden weitere lysosomale Metabolite identifiziert, von denen angenommen wird, dass sie keine Produkte aus dem lysosomalen Abbauprozess sind. Für diese Metabolite sind die Importer, die diese Metabolite in das Lysosom transportieren, noch weitestgehend unbekannt.

In dieser Studie wurde ein neu identifizierter lysosomaler Transporter, Major Facilitator Superfamily Domain containing 1 (MFSD1), biochemisch charakterisiert und seine physiologische Rolle in der Maus anhand einer neu erzeugten MFSD1-defizienten Mauslinie untersucht.

MFSD1 wird ubiquitär in Mausgeweben exprimiert. Im Rahmen der Arbeit wurde ein dileucinbasiertes lysosomales Transportmotiv, welches für den Transport von MFSD1 zu den Lysosomen notwendig ist, identifiziert. Weiterhin wurde GLMP, ein hochglykosyliertes lysosomales Membranprotein, als Interaktionspartner von MFSD1 identifiziert. Die Stabilität von MFSD1 und GLMP ist hierbei stark voneinander abhängig. In Abwesenheit von GLMP lag MFSD1 sowohl in Mausgewebe, als auch in kultivierten Zellen, um bis zu 90 % reduziert vor.

Die MFSD1-defizienten Mäuse zeigten einen sehr komplexen Phänotyp auf, der auf eine essentielle Rolle von MFSD1 in der Physiologie der Leber, der Knochen, der Niere und des Immunsystems hindeutet. MFSD1-defiziente Mäuse leiden an einer Leberschädigung, die durch den Verlust von Sinusoiden, Extravasation von Erythrozyten, Fibrose und Neokapillarisation gekennzeichnet ist, eine Pathologie, die der von Patienten mit sinusoidalen obstruktiven Syndrom (SOS) ähnelt. Weiterhin besitzen SOS-Patienten mit einer Mutationen im Transkriptionsfaktor sp110 eine Immunschwäche, welche interessanterweise auch bei MFSD1-defiziente Mäuse auftritt, da bei ihnen die Reifung der B-Lymphozyten beeinträchtigt ist. Dies deutet auf eine mögliche Rolle von MFSD1 in der Pathologie von SOS-Patienten mit Immunschwäche hin. Zusätzlich ist die Mineralisierungsfähigkeit von MFSD1-defizienten Osteoblasten in der Wirbelsäule beeinträchtigt, was zu einer verminderten Knochenmineraldichte führt. Darüber hinaus führt der Verlust von MFSD1 auch zu einer

Vergrößerung der Lysosomen in den proximalen Tubuli der Niere. Ein solcher Anstieg könnte auf eine mögliche Akkumulation des (der) normalerweise von MFSD1 transportierten Substrat(en) zurückzuführen sein. Zudem ist der Phänotyp von GLMP-defizienten Mäusen identisch mit dem der MFSD1-Knockout-Mäuse, was die starke Abhängigkeit der beiden Proteine weiter verdeutlicht.