

Achtergrond

De vorming van gal is een belangrijke functie van de lever. Gal is een waterige vloeistof die door de lever via de galwegen in de darm wordt uitgescheiden. De hepatocyten (of leverparenchymcellen) zijn verantwoordelijk voor de galvorming en vormen de verbinding tussen het bloed en de gal. De aan het bloed grenzende zijde van deze cellen wordt het sinusoidale membraan genoemd. Tussen de naast elkaar gelegen hepatocyten liggen de galkanaaltjes. Hierlangs wordt gal afgevoerd naar de galwegen. Het deel van de celmembraan dat aan deze galkanaaltjes (of galcanaliculi) grenst, heet het canaliculaire membraan. Via de galkanalen kan gal worden opgeslagen in de galblaas om uiteindelijk te worden uitgescheiden in de darm. In de darm is gal essentieel voor de voedselvertering: het speelt een rol in de absorptie van vetten en vetoplosbare vitaminen afkomstig uit het dieet. Verder is gal een belangrijke afvoerroute voor een aantal stoffen, waaronder cholesterol. Via uitscheiding naar de gal en uiteindelijk de darm, kan een overmaat aan cholesterol het lichaam verlaten. Voor de vorming van gal zijn transporteiwitten nodig. Deze transporteiwitten zorgen ervoor dat stoffen, waarvoor het membraan een moeilijk te nemen barrière vormt, toch de hepatocyt kunnen binnenkomen en weer verlaten. Eiwitten die gelokaliseerd zijn op de sinusoidale membraan zijn in staat om stoffen vanuit het bloed op te nemen. Canaliculaire transporteiwitten kunnen stoffen vanuit de hepatocyt naar de galkanaaltjes uitscheiden. Belangrijke componenten van gal zijn galzouten, fosfolipiden, cholesterol en bilirubine en met name leden van de ABC familie van transporteiwitten spelen een rol in de uitscheiding van deze stoffen. ABC transporteiwitten transporteren stoffen, tegen een concentratiegradiënt in, de cel uit. De afwezigheid of een verminderde vorming van gal wordt cholestase genoemd en leidt tot de ophoping van galbestanddelen in het bloed, hetgeen aanleiding kan geven tot geelzucht als gevolg van bilirubine ophoping. Aan de ontwikkeling van cholestase in patiënten kunnen verschillende oorzaken ten grondslag liggen. Medicijnen of toxische verbindingen kunnen de lever beschadigen, waardoor de uitscheiding naar de gal verminderd wordt. Daarnaast kan de afwezigheid van transporteiwitten door genetische defecten een oorzaak zijn. Recentelijk is bekend geworden dat nucleaire receptoren betrokken zijn bij het aan- en uitzetten van genen die de genetische code van verschillende transporteiwitten bevatten. Nucleaire receptoren zijn eiwitten die in de kern van de cel voorkomen en in staat zijn om stoffen (liganden) te binden. Na binding van een ligand raken nucleaire receptoren geactiveerd. De geactiveerde receptor herkent een specifieke DNA sequentie in een gen, kan eraan binden en vervolgens de 'aflezing' van het gen beïnvloeden (transcriptionele regulatie). Naast de transporteiwitten spelen deze receptoren ook een rol bij de transcriptionele regulatie van genen die betrokken zijn bij het galzout- en cholesterolmetabolisme. Voedingstoffen, endogene metaboliëten en medicijnen zijn (als mogelijk ligand) in staat om nucleaire receptoren te activeren en zouden hierdoor effecten kunnen hebben op de transporteractiviteit en galvorming in de lever.

Doel

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het definiëren van de rol van bepaalde nucleaire receptoren in de regulatie van transporterexpressie. Hierbij is het effect van veranderde transporterexpressie gekoppeld aan het fysiologisch effect op galvorming. De meeste resultaten gepubliceerd over dit onderwerp zijn uitgevoerd in *in vitro*

systemen, waarbij de relevantie voor de *in vivo* situatie lang niet altijd duidelijk wordt. Dit proefschrift beschrijft de *in vivo* effecten van verschillende nucleaire receptoren, te weten de ‘peroxisome proliferator-activated receptor *alpha*’ (PPAR α), de ‘liver X receptor’ (LXR) en de ‘farnesoid X receptor’ (FXR), op de expressie van transporters en het fysiologisch effect van veranderde transporterexpressie op galvorming. Bij de experimenten wordt gebruik gemaakt van muis knock-out modellen waarin de nucleaire receptor is uitgeschakeld en van liganden die in staat zijn de nucleaire receptoren te activeren. Verder is in een aantal studies ook gekeken naar de rol van nucleaire receptoren op het cholesteroltransport en de enterohepatische circulatie van galzouten. Dit laatste betreft de circulatie van galzouten in het lichaam vanuit de lever naar de darm en via het bloed weer terug naar de lever.

Resultaten en conclusies

In **hoofdstuk 1** van dit proefschrift wordt een overzicht gegeven van in de lever en de darm aanwezige transportsystemen die relevant zijn voor de uitgevoerde studies. Tevens wordt informatie gegeven over galvorming en nucleaire receptoren alsook over het cholesterol- en galzoutmetabolisme.

In de studie beschreven in **hoofdstuk 2** is gekeken naar de expressie van transporteiwitten en galvorming in afwezigheid van de ‘peroxisome proliferator-activated receptor α ’ (PPAR α) door gebruik te maken van PPAR α -deficiënte muizen. PPAR α is een nucleaire receptor die betrokken is bij de regulatie van de vetzuuroxidatie in de lever, maar ook bij het galzoutmetabolisme. PPAR α wordt geactiveerd door vetzuren (natuurlijk ligand) en door fibraten (synthetisch ligand). Fibraten zijn medicijnen die gebruikt worden door patiënten met hypertriglyceridemie en zijn in staat om plasma triglyceriden te verlagen en plasma ‘high density lipoprotein’ (HDL) cholesterol te verhogen. Daarnaast hebben ze een mogelijk effect op galcompositie. De resultaten van deze studie laten zien dat de afwezigheid van PPAR α op zich geen invloed heeft op belangrijke transportsystemen in de lever, noch op galvorming, onder normale standaard dieet condities. Stimulatie van PPAR α -activiteit door middel van ciprofibaat resulteert in een specifieke inductie van Mdr2-expressie en Mdr2-functie. Mdr2 is een canaliculaire ABC transporter die betrokken is bij de fosfolipidenuitscheiding naar de gal. De inductie van Mdr2 is PPAR α -afhankelijk aangezien deze inductie niet plaatsvindt in PPAR α -deficiënte muizen. Na behandeling met ciprofibaat wordt naast een verhoogde expressie van Mdr2 ook een verhoogde mRNA expressie van *Mdr1a* en *Mdr1b* waargenomen. Deze verhoging is echter alleen *in vivo* waarneembaar en lijkt eerder gerelateerd te zijn aan peroxisoom prolifererende capaciteiten of metabole veranderingen van ciprofibaat dan aan een direct effect van PPAR α -regulatie.

Een fysiologische conditie waarbij PPAR α geactiveerd raakt is tijdens vasten. Vetzuren die vrijkomen van het vetweefsel tijdens vasten worden gedeeltelijk opgenomen in de lever. Hier kunnen ze dienen als ligand voor PPAR α . **Hoofdstuk 3** behandelt de effecten op transportsystemen en galvorming in wildtype en PPAR α -deficiënte muizen na vasten. Muizen hebben gedurende 24 uur gevast en zijn vervolgens gedurende 48 uur hervoedt. Deze studie toont aan dat vasten de expressie en functie van Mdr2 induceert op een PPAR α -afhankelijke manier. De PPAR α -afhankelijke verhoging van de mogelijke cholesteroltransporter-genen *Abcg5* en *Abcg8* tijdens vasten is niet gekoppeld aan verhoogde cholesteroluitscheiding naar de gal. Tijdens vasten lijkt de cholesterolsecretie naar

de gal dus niet gereguleerd te worden door *Abcg5/Abcg8*.

In **hoofdstuk 4** is geprobeerd te achterhalen wat de mogelijke rol van PPAR α in de regulatie van het humane *MDR3*-gen is. Humaan MDR3 is de homoloog van muis *Mdr2*. Humane hepatocyten behandeld met verschillende PPAR α -agonisten laten verhoogde *MDR3* mRNA expressie zien. Een mogelijk 'peroxisome proliferator response element' (PPRE) is gevonden op ~4.9 kilobasen stroomopwaarts van de 'transcription initiation site'. Deze sequentie is *in vitro* getest door middel van electroforetische mobiliteit-shift-assays en luciferase-studies. Aangevoerd wordt dat de sequentie functioneel is en in staat is het PPAR α /RXR-complex te binden. Mogelijk vindt regulatie van het humane *MDR3*-gen plaats op transcriptioneel nivo door middel van binding van PPAR α /RXR aan de gevonden PPRE. Vijf en half kilobasen van de humane MDR3-promoter zijn gekloneerd en vervolgstudies zullen moeten uitmaken of *MDR3* een 'echt' PPAR α -gen is.

De 'liver X receptor' (LXR) is een belangrijke regulator van het cholesterol-metabolisme. Oxysterolen (geoxideerde metabolieten van cholesterol) zijn natuurlijke liganden voor LXR. In **hoofdstuk 5** zijn wildtype en *Abca1*-deficiënte muizen behandeld met de synthetische LXR agonist T0901317. Hierbij is gekeken naar de rol van LXR in galvorming, voornamelijk gericht op cholesterol. *Abca1*-deficiënte muizen worden gekarakteriseerd door de afwezigheid van HDL. HDL is belangrijk in het proces van 'reverse cholesterol transport', waarbij een teveel aan cholesterol vanuit de perifere cellen via HDL naar de lever wordt getransporteerd. Daarnaast wordt verondersteld dat HDL een belangrijke bron is voor cholesterol dat bestemd is voor de gal. Desondanks laten de resultaten van deze studie zien dat gedurende LXR-activatie door T0901317 zowel de wildtype als de *Abca1*-deficiënte muizen een verhoogde cholesteroluitscheiding naar de gal vertonen. Deze verhoogde cholesteroluitscheiding wordt samen gezien met verhoogde hepatische (en intestinale) *Abcg5* en *Abcg8* mRNA expressie. De neutrale steroluitscheiding naar de faeces is ook verhoogd tijdens LXR-activatie in wildtype en *Abca1*-deficiënte muizen. Dit wordt waargenomen onafhankelijk van plasma HDL en de (mogelijke) rol van *Abca1* in intestinale cholesterolabsorptie. Het lijkt erop dat de veronderstelde rol van HDL in 'reverse cholesterol transport' herziening behoeft.

De galzout geactiveerde 'farnesoid X receptor' (FXR) is betrokken bij de regulatie van genen in het galzout- en lipidmetabolisme. Het is bekend dat galzouten hun eigen synthese kunnen remmen via FXR. Verder induceert FXR de expressie van de canaliculaire galzoutpomp *Bsep*. In **hoofdstuk 6** is bepaald wat de *in vivo* rol van FXR is op de enterohepatische circulatie van galzouten door middel van het kwantificeren van de galzoutkinetiek in FXR-deficiënte muizen. Hierbij is gebruik gemaakt van een stabiele isotopenverdunningsmethode, waarbij stabiel gelabeld cholaat intraveneus wordt toegediend. Cholaat is het meest voorkomende galzout in de muis. De kinetische parameters zijn gerelateerd aan galvorming en de expressie van hepatische en intestinale transporters betrokken bij de enterohepatische circulatie van galzouten. De studies zijn uitgevoerd in een nieuw knock-out muismodel van FXR, gegenereerd door homologe recombinatie. De afwezigheid van FXR in muizen laat een verlaagde expressie van *Bsep* zien, terwijl de galzoutsecretie naar de gal verhoogd is tijdens normale standaard dieet condities. Daarnaast is deficiëntie van FXR gekoppeld aan verhoogde cholesterol 7 α -hydroxylase (*Cyp7a1*) mRNA expressie die overeenkomt met een verhoogde cholaatsynthesesnelheid. Dit leidt tot een toename van de cholaatpoolgrootte in FXR-deficiënte muizen. Het intestinale galzoutbindende eiwit *Ibapb* is een bekend FXR-gen en het wordt verondersteld betrokken te zijn bij intracellulair transport van galzouten in de enterocyt. Resultaten

laten zien dat dit eiwit afwezig is in het laatste deel van het ileum van FXR-deficiënte muizen. Ondanks de afwezigheid van Ibabp is de cholaatreabsorptie in de darm verhoogd. De afwezigheid van Ibabp lijkt dus geen negatieve invloed te hebben op de enterohepatische circulatie van galzouten in de muis.

Een vergelijkbare serie van experimenten is uitgevoerd in **hoofdstuk 7**, waarbij ratten behandeld worden met de synthetische FXR-agonist GW4064. Hierbij wordt gekeken naar het effect van chronische activatie van FXR op de enterohepatische circulatie van galzouten. De studie toont aan dat chronische activatie van FXR de basale galvorming niet beïnvloedt, ondanks het feit dat *Bsep* mRNA expressie verhoogd is. Naar verwachting en tegenovergesteld aan de situatie in de FXR-deficiënte muis, leidt activatie van FXR tot een verlaagde cholaatsynthesesnelheid en een verlaagde cholaatpoolgrootte. Tijdens activatie van FXR zijn Ibabp eiwitniveaus verhoogd in het ileum, met een verschuiving naar de meer proximale segmenten. Niettemin is de absolute hoeveelheid cholaat die gereabsorbeerd wordt door de darm niet verhoogd. De data van hoofdstuk 6 en 7 impliceren dat de veronderstelde rol van Ibabp in galzouttransport herziening behoeft.

Hoofdstuk 8 geeft een overzicht van de nu bekende ABC-transportersystemen die betrokken zijn bij galvorming en die gelokaliseerd zijn in de hepatocyt. ABC-transportergen knock-out muismodellen worden vergeleken met karakteristieke kenmerken van erfelijke (cholestatische) ziekten in mensen die veroorzaakt worden door mutaties in deze ABC transporters. Verder worden verschillende nucleaire receptor knock-out muismodellen besproken in hoeverre deze de expressie van ABC-transporters en galvorming beïnvloeden.

Geconcludeerd kan worden dat nucleaire receptoren een functie vervullen als transcriptionele regulatoren van hepatische (en intestinale) transportergenen. Nucleaire receptoren kunnen worden beschouwd als een soort metabole sensoren. Ze zijn in staat specifieke stofwisselingspaden aan te zetten of uit te schakelen en hiermee te voorkomen dat cellen te veel blootgesteld worden aan specifieke producten. De meeste gegevens die tot nu toe gepubliceerd zijn over transporterregulatie door nucleaire receptoren betreffen *in vitro* systemen. Studies beschreven in dit proefschrift tonen de relevantie aan voor de *in vivo* situatie. Aangevoerd wordt dat regulatie van transportergenen door nucleaire receptoren in de meeste gevallen leidt tot fysiologische effecten op galvorming. Nucleaire receptoren zouden geschikt kunnen zijn als farmacologisch ‘target’ om metabole en cholestatische leverziekten in de toekomst beter te kunnen behandelen.

