

Regulation of hepatobiliary transport function by nuclear receptors

Proefschrift van: Tineke Kok

De vorming van gal is een belangrijke functie van de lever. Gal 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. Voor de vorming van gal zijn transporteiwitten nodig. De afwezigheid of verminderde vorming van gal wordt cholestase genoemd en leidt tot ophoping van galbestanddelen in het bloed. Medicijnen of toxische verbindingen kunnen de lever beschadigen, waardoor 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 de transcriptionele regulatie van genen die coderen voor transporteiwitten. Hiernaast spelen deze receptoren ook een rol bij de transcriptionele regulatie van genen die betrokken zijn bij het galzout- en cholesterolmetabolisme. 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 transportexpressie op galvorming. Verder is in een aantal studies ook gekeken naar de rol van nucleaire receptoren op het cholesteroltransport en de enterohepatische circulatie van de galzouten.

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 PPAR α door gebruik te maken van PPAR α -deficiënte muizen. 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 ciprofibrat resulteert in een specifieke inductie van Mdr2-expressie en Mdr2-functie. De inductie van Mdr2 is PPAR α -afhankelijk aangezien deze inductie niet plaatsvindt in PPAR α -deficiënte muizen. Na behandeling met ciprofibrat wordt naast een verhoogde expressie van Mdr2 ook een verhoogde mRNA expressie van *Mdr1a* en *Mdr1b* waargenomen.

Een fysiologische conditie waarbij PPAR α geactiveerd raakt is tijdens vasten. **Hoofdstuk 3** behandelt de effecten op transportsystemen en galvorming in wildtype en PPAR α -deficiënte muizen na vasten. 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 humane *MDR3*-gen is. Een mogelijke PPRE is gevonden op ~4.9 kilobasen stroomopwaarts van de 'transcription initiation site'. Aangetoond wordt dat de sequentie functioneel is en in staat is het PPAR α /RXR-complex te vinden. Mogelijk vindt regulatie van het humane *MDR3*-gen plaats op transcriptioneel nivo door middel van binding met PPAR α /RXR aan de gevonden PPRE.

De 'liver X receptor' (LXR) is een belangrijke regulator van het cholesterolmetabolisme. 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. De resultaten van deze studie laten zien dat gedurende LXR-activatie door T0901317 zowel de wildtype als de *Abca1*-deficiënte muizen een verhoogde cholesteroluitscheiding naar de gal vertonen. 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.

De galzout geactiveerde 'farnesoid X receptor' (FXR) is betrokken bij de regulatie van genen in het galzout- en lipidenmetabolisme. 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. Deficiëntie van FXR is gekoppeld aan verhoogde cholesterol 7 α -hydroxylase (*Cyp7a1*) mRNA expressie die overeenkomt met een verhoogde cholestaatsynthesesnelheid. Dit leidt tot een toename van de cholaatpoolgrootte in

FXR-deficiënte muizen. Resultaten laten zien dat Ibabp afwezig is in het laatste deel van het ileum van FXR-deficiënte muizen. Ondanks de afwezigheid van Ibabp is de cholaatabsorptie in de darm verhoogd.

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 enterhepatische circulatie van galzouten. 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 geresorbeerd 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 hepcyot. ABC-transportergenen 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 verschillen nucleaire receptor knock-out muismodellen besproken in hoeverre deze de expressie van ABC-transporters en galvorming beïnvloeden.

Geconcludeerd kan worden 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.