

## Samenvatting proefschrift: 'Novel insights in familial intrahepatic cholestasis syndromes'

Galvorming is een van de belangrijkste functies van de lever; het is verantwoordelijk voor de uitscheiding van cholesterol, bilirubine en andere toxische stoffen uit het lichaam. Gal heeft ook een belangrijke functie in de darm, waar het zorgt voor de absorptie van vetten en vetoplosbare vitamines afkomstig uit het dieet. Galzouten, de belangrijkste bestanddelen van gal, worden gesynthetiseerd in levercellen uit cholesterol en vervolgens uitgescheiden in de galkanaaltjes. Dit proces is de drijvende kracht achter galvorming. Gal wordt opgeslagen in de galblaas en wanneer voedsel in het maag-darm kanaal aanwezig is, trekt de galblaas samen en wordt de gal getransporteerd naar de twaalfvingerige darm. Vervolgens worden de galzouten actief geresorbeerd uit de dunne darm en worden ze via het portale veneuze systeem via actief transport opgenomen in hepatocyten om opnieuw in gal te worden uitgescheiden. Omdat galzouten zeer toxisch zijn, is het van het grootste belang dat zowel de aanmaak als het transport van galzouten door de lever, galwegen en darmen goed gereguleerd wordt. Cholestase is een frequent voorkomende en ernstige manifestatie van verworven en erfelijke leverziekten en wordt gekenmerkt door een verstoring in de galvorming. Karakteristiek voor cholestase zijn verhoogde concentraties van galzouten en bilirubine in plasma en lever, resulterend in leverschade en geelzucht. Opheldering van verscheidene genetische defecten die ten grondslag liggen aan erfelijke intrahepatische cholestase syndromen zijn de laatste jaren van groot belang geweest voor onze kennis omtrent galvorming. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is om verder inzicht te krijgen in het transport proces van galzouten in de gal in relatie tot cholestase. Daartoe werden FIC1 en BSEP bestudeerd; eiwitten gemuteerd in twee erfelijke vormen van cholestase.

Gedurende de afgelopen 10 jaar is de genetische achtergrond van verschillende erfelijke cholestase syndromen opgehelderd en worden de functies van de gemuteerde genen bestudeerd. De de genetica van erfelijke cholestase syndromen en de functies van de betreffende gemuteerde eiwitten in galvorming worden uiteen gezet, als ook de regulatie van deze eiwitten door galzouten. Cholestase kan het gevolg zijn van mutaties in verschillende genen coderend voor enzymen betrokken bij de omzetting van cholesterol in galzouten of door mutaties in genen die coderen voor galzout transport eiwitten. Daarnaast kunnen een defect in het transport van fosfolipiden door de plasma membraan of een defect in vesiculair transport leiden tot cholestase.

In een samenwerkings verband onderzochten we één van de erfelijke ziekten die tot cholestase leiden, FIC1 deficiëntie. Deze ziekte behelst twee verschillende klinische entiteiten, maar beide worden veroorzaakt door mutaties in één gen, *ATP8B1*, dat codeert voor het eiwit FIC1. Deze genetische definitie van de ziekte is in het leven geroepen omdat wij aanwijzingen hebben dat de twee klinische entiteiten Progressieve familiäre intrahepatische cholestase type 1 (PFIC1) en Benigne Recurrente intrahepatische cholestase (BRIC) uiteinden zijn van een klinisch continuüm. De recente klinische, histopathologische en genetische bevindingen van patiënten met FIC1 deficiëntie worden uiteen gezet.

Om te komen tot een fundamentele basis voor onze kennis van de functie van FIC1 in galzouttransport, onderzochten we het subcellulaire expressie patroon van FIC1 in verschillende weefsels. Om dit te kunnen bewerkstelligen hebben we in konijnen antisera opgewekt tegen recombinante FIC1 fusiepeptiden. FIC1 werd specifiek gedetecteerd als een 140-kD eiwit, welke niet detecteerbaar was in de lever van een PFIC1 patiënt. We laten zien dat in humane en knaagdier levers, FIC1 aanwezig is in de canaliculaire membraan van hepatocyten en cholangiocyten. De lokalisatie van FIC1 in de lever suggereert dat FIC1 een directe of indirecte rol speelt in galformatie omdat mutaties in *ATP8B1* geassocieerd zijn met ernstige symptomen van cholestase. FIC1 is in veel hogere mate aanwezig in de darm, consistent met recente bevindingen in PFIC1 patiënten en in een muis model van PFIC1, waarin gesuggereerd wordt dat verhoogde opname van galzouten in de darm een belangrijke rol speelt in het ontstaan van cholestase in FIC1 deficiëntie. Daarom onderzochten we de subcellulaire lokalisatie van FIC1 in de darm, pancreas en maag van muizen, om een beter inzicht te krijgen in de rol van het maag-darm stelsel in FIC1 deficiëntie. We laten zien dat FIC1 gelokaliseerd is in apicale membranen van diverse epitheliale cellen; van enterocyten, pancreas acinus cellen, en epitheliale cellen die de wand van de maag bekleden. In de darm is FIC1 expressie niet beperkt tot de delen waar actieve resorptie van galzouten plaatsvindt; apicale membranen van enterocyten in de hele darm brengen FIC1 tot expressie. Omdat PFIC1 zich zeer snel na de geboorte manifesteert, onderzochten we FIC1 eiwit expressie tijdens de postnatale ontwikkeling van muizen, wanneer ook de galzout concentraties in de enterohepatische circulatie stijgen naar concentraties in volwassenen. We laten zien dat regulatie plaats vindt tijdens de postnatale ontwikkeling in de dunne darm. FIC1 komt niet of nauwelijks tot expressie 7 en 14 dagen na de geboorte van de muis, maar de expressie nam sterk toe 21 dagen na de geboorte, wanneer de muizen worden gespeend en zij vast voedsel gaan eten. In tegenstelling tot de dunne darm is de expressie van FIC1 niet verminderd in de pancreas, maag en lever tijdens de postnatale

ontwikkeling van de muis. We concluderen dat FIC1 expressie in de apicale membranen van epitheliale cellen weefsel-specifiek is en wordt gereguleerd tijdens de postnatale ontwikkeling. Het is mogelijk dat de stijging in galzout concentraties in de darm tijdens de postnatale ontwikkeling verantwoordelijk is voor de toename in FIC1 expressie in de darm. De brede expressie van FIC1 in het maag-darm stelsel, ook in weefsels niet betrokken bij galzout transport, suggereert dat FIC1 een algemeen celbiologische functie heeft. Verder onderzoek is nodig om de functie van FIC1 te onderzoeken.

Mutatie analyse van DNA van PFIC1 en BRIC patiënten heeft geleid tot de ontdekking van diverse mutaties in *ATP8B1*. Er is gebleken dat in een aantal BRIC en PFIC patiënten geen mutaties in *ATP8B1* aanwezig zijn. Dit suggereert dat de ziekte genetische heterogeniteit vertoont. Dit was al eerder aangetoond voor PFIC; naast mutaties in *ATP8B1* kan PFIC ook worden veroorzaakt door mutaties in *ABCB11*, het gen dat codeert voor BSEP, de belangrijkste galzout transporter in de lever. Patiënten met mutaties in *ABCB11* worden PFIC2 patiënten genoemd. Voor BRIC was genetische heterogeniteit nog niet eerder aangetoond. Daarom probeerden we een tweede locus voor BRIC te vinden. We hypothetiseerden dat mutaties in *ABCB11* geassocieerd zijn met BRIC. Sequentie analyse van alle 27 exonen inclusief de intron-exon overgangen van *ABCB11* van 20 BRIC families waarin mutaties in *ATP8B1* waren uitgesloten, onthulde 8 verschillende mutaties in *ABCB11* in 11 patiënten van 8 verschillende families. Er werden 7 missense mutaties en een mogelijke splice site mutatie geïdentificeerd. Om onderscheid te maken tussen de twee genetisch verschillende vormen van BRIC, noemden we BRIC veroorzaakt door mutaties in *ATP8B1* BRIC type 1 (BRIC1) en BRIC veroorzaakt door mutaties in *ABCB11* BRIC type 2 (BRIC2), zoals dit ook gedaan wordt om verschillende vormen van PFIC te onderscheiden. In 12 families werden geen mutaties in zowel *ATP8B1* als in *ABCB11* gevonden. Dit impliceert dat er mogelijk nog een derde locus voor autosomaal recessief BRIC is. Pancreatitis komt regelmatig voor als extrahepatisch symptoom in BRIC1 patiënten, maar werd niet gezien in BRIC2 patiënten. Galstenen werden geobserveerd in 7 van de 11 BRIC2 patiënten, maar zijn niet eerder beschreven in BRIC1 patiënten. Omdat deze symptomen variabel zijn, is het vooralsnog niet mogelijk om de twee verschillende BRIC populaties te onderscheiden op enkel klinische gronden. We speculeren dat BRIC2 veroorzaakt wordt door relatief milde mutaties in *ABCB11*, in tegenstelling tot PFIC2, waar mutaties die zeer waarschijnlijk een heel ernstig effect hebben op de lokalisatie en/of functie van *ABCB11* veel vaker voorkomen. Ook hier speculeren we dat BRIC2 en PFIC2 uiteinden zijn van een klinische continuüm. Deze hypothese wordt aannemelijk gemaakt door het feit dat drie patiënten een intermitterende vorm laten zien.

De resultaten beschreven in dit proefschrift hebben belangrijke implicaties voor onze kennis van de enterohepatische circulatie van galzouten en erfelijke cholestase: we geneerden nieuwe inzichten in de biologie van FIC1 en in de genetische heterogeniteit van BRIC. Verder heeft dit werk ook implicaties voor de pathogenese van galsteen formatie en de ontogenese van galzouttransport.