

University of Groningen

Effects of bile salts on hepatic lipoprotein production

Elzinga, Baukje Marije

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2003

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Elzinga, B. M. (2003). *Effects of bile salts on hepatic lipoprotein production*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



Nederlandse Samenvatting

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Een verhoogde VLDL productie is een gemeenschappelijk kenmerk van verschillende veel voorkomende ziektes zoals diabetes type II en obesitas (vetzucht). Een betere kennis van het regulatiemechanisme van VLDL productie kan bijdragen aan een verdere ontwikkeling van nieuwe methoden om deze ziekten te behandelen en te voorkomen. De afgelopen jaren hebben verscheidene onderzoeksgroepen zich gericht op een mogelijke regulerende functie van galzouten in het VLDL metabolisme. In klinische studies werden patiënten met erfelijke hypertriglyceridemie beschreven met een intestinale galzout malabsorptie, wat recentelijk in verband gebracht werd met verlaagde expressie van de intestinale galzout opnametransporteur "bile salt uptake transporter" ASBT. Een ASBT remmer, die toegediend werd aan cavia's, veroorzaakte een duidelijke verhoging van de plasma VLDL-triglyceride (TG) concentratie en bevorderde vorming van grotere VLDL deeltjes.

In overeenstemming met een mogelijke regulerende rol voor galzouten in VLDL metabolisme bleken galzouten secretie van VLDL-TG door primaire humane en rat hepatocyten *in vitro* te remmen op een dosisafhankelijke manier. De onderzoeken beschreven in dit proefschrift werden uitgevoerd om het effect van galzouten op VLDL productie *in vivo* te kwantificeren en om mechanisme(s) te onderzoeken via welke galzouten de VLDL productie remmen.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de op dit moment bestaande kennis over het lipoproteïnenmetabolisme, met extra aandacht voor VLDL vorming, over het galzoutmetabolisme en de relatie tussen galzoutmetabolisme en VLDL productie.

In **hoofdstuk 2** worden de effecten van acute en chronische verandering van de transhepatische galzoutflux op VLDL-TG productie beschreven in twee diermodellen. Ten eerste werd de VLDL-TG productie bestudeerd in galafgeleide ratten, waarvan de gal was afgeleid gedurende 1 week gevolgd door een intraduodenaal infuus met galzouten gedurende een aantal uren. De resultaten van deze experimenten toonden aan dat een directe (acute) verandering van de galzoutflux geen effect had op de plasma TG concentratie, de hepatische TG productiesnelheid en de lipidencompositie van het VLDL. Echter, toen in muizen de transhepatische galzoutflux gedurende 3 weken door middel van het voeren van een taurocholaat- of cholestyraminebevattend dieet werd veranderd, vonden we een omgekeerd evenredige relatie tussen transhepatische galzoutflux en óf plasma TG concentratie ($R^2=0.89$) óf VLDL-TG productiesnelheid ($R^2=0.87$). Deze

experimenten toonden aan dat een meer langdurige verandering van de galzoutflux in muizen *in vivo* wel de plasma TG concentratie kon verlagen en de VLDL-TG productie door de lever kon remmen. Echter, de galzout-gemedieerde effecten op VLDL-TG productie waren relatief klein en werden alleen waargenomen bij suprafysiologische galzoutfluxen in muizen.

Eerdere studies van onze onderzoeksgroep toonden het bestaan van een omgekeerde relatie tussen intracellulaire galzoutconcentratie en VLDL-TG secretie aan in hepatocyten *in vitro*. De intracellulaire galzoutconcentratie wordt voornamelijk bepaald door expressie en activiteit van basolaterale en canaliculaire galzouttransporteiwitten. Andersom is ook aangetoond dat galzouten hun eigen opname en secretie kunnen reguleren door hepatische galzouttransporteiwitten te beïnvloeden. In **hoofdstuk 3** worden de effecten van veranderde galzoutflux op expressie van levertransporteiwitten beschreven *in vivo* in hetzelfde muismodel als beschreven in hoofdstuk 2. Ook werd de expressie van levertransporteiwitten in *Cyp7A^{-/-}* muizen met een sterk verlaagde galzoutpool (muizen deficiënt in het enzym cholesterol 7 α hydroxylase) onderzocht. De resultaten beschreven in dit hoofdstuk tonen aan dat grote variaties in transhepatische galzoutflux een relatief klein effect hebben op de expressie van de galzouttransporteiwitten Ntcp (basolateraal) en Bsep (canaliculair) in de lever *in vivo*. De resultaten suggereren dat de eiwitexpressie van deze transporteiwitten niet snelheidsbepalend is voor de transhepatische galzoutflux onder fysiologische omstandigheden en dat de lever grote veranderingen in galzoutflux makkelijk kan verwerken. De aanwezigheid van Bsep en Ntcp is homogeen verdeeld over alle zones in de lever, terwijl galzouttransport, zelfs tijdens hoge galzoutfluxen, voornamelijk in de periportale zone plaatsvindt. Dit ondersteunt het concept dat de lever een overmaat aan transportcapaciteit bezit voor het verwerken van galzouten.

In **hoofdstuk 4** werd de rol van de nucleaire hormoon receptor “Liver x receptor” (LXR) in VLDL productie bestudeerd. Oxysterolen, metaboliëten van cholesterol die ook tussenproducten kunnen zijn in galzoutsynthese, kunnen binden aan LXR en LXR vervolgens activeren. In de afgelopen paar jaren werd aangetoond dat geactiveerd LXR verschillende genen in galzout- en vetmetabolisme beïnvloedt. Daarom werd onderzocht of geactiveerd LXR ook een effect heeft op VLDL productie door de lever. Om LXR activiteit te induceren kregen mannelijke wild type C57BL/6J muizen een synthetische LXR agonist toegediend gedurende 5 dagen. De resultaten in dit hoofdstuk laten zien dat een verhoogd HDL wordt vergezeld door ongunstig effecten op het

triglyceridenmetabolisme. LXR activatie in muizen resulteerde in de ontwikkeling van een vette lever en uitscheiding van grote VLDL deeltjes verrijkt in TG. Een gemeten tweevoudig verhoogde VLDL-TG productie werd gecompenseerd door een efficiënte lipolyse en klaring van deze grotere VLDL deeltjes, want basale plasma TG waarden van met agonist behandelde muizen waren gelijk aan waarden in controlemuizen. Muizen met een defecte lipoproteïenklaring (apoE^{-/-} LDLr^{-/-} dubbele knockouts, APOE*3-Leiden transgenen) die de LXR agonist kregen toegediend, ontwikkelden een duidelijke hypertriglyceridemie.

Recentelijk werd aangetoond dat galzouten de natuurlijke liganden zijn voor de nucleaire hormoon receptor “Farnesoid x receptor” (FXR) en dat ze via activatie van FXR niet alleen hun eigen biosynthese kunnen remmen (feedback mechanisme), maar ook verschillende genen in het vetmetabolisme kunnen beïnvloeden. **Hoofdstuk 5** beschrijft de effecten van FXR deficiëntie op de vorming van TG-rijke lipoproteïnen door de lever en de darm *in vivo* in muizen en *in vitro* in geïsoleerde primaire hepatocyten afkomstig van FXR-deficiënte muizen. Onder basale condities werd in FXR-deficiënte (*Fxr*^(-/-)) muizen een 2 keer verhoogde plasma TG concentratie in de VLDL fracties gemeten. De verhoogde plasma TG concentratie werd niet veroorzaakt door een verhoogde hepatische TG productie, want er werden gelijke TG productiesnelheden gemeten in zowel controlemuizen als in *Fxr*^(-/-) muizen. Echter, *Fxr*^(-/-) muizen bleken grotere VLDL deeltjes verrijkt in TG te produceren. In tegenstelling tot de VLDL productie was de intestinale chylomicronenproductie in *Fxr*^(-/-) muizen wel verlaagd (met ~50%) en werden er ~2 keer zo kleine chylomicronendeeltjes gemeten.

In vitro bleek de basale VLDL-TG secretie door *Fxr*^(-/-) hepatocyten 30% lager te liggen dan van controle hepatocyten. Incubatie met fysiologische concentraties van het galzout taurocholaat remde de VLDL-TG secretie sterk in zowel controle hepatocyten als in *Fxr*^(-/-) hepatocyten. Dit toont aan dat de remming van galzouten op VLDL-TG secretie *in vitro* onafhankelijk is van FXR activatie.

Het onderzoek uit **hoofdstuk 5** toont aan dat uitschakeling van FXR de vorming van TG-rijke lipoproteïnen verandert/ verstoort in zowel de lever als de darm *in vivo*. De hypertriglyceridemie in *Fxr*^(-/-) muizen wordt niet veroorzaakt door een verhoogde productie van TG-rijke lipoproteïnen door lever en/of darm, maar waarschijnlijk door een verstoorde verwerking in de circulatie van anders samengestelde TG-rijke lipoproteïnen.

In **hoofdstuk 6** hebben we verder onderzoek gedaan naar het mechanisme achter de remmende werking van galzouten op VLDL secretie *in vitro*. We hebben onderzocht of

galzouten VLDL secretie remmen door het proces van lipidering van apolipoprotein B tot een TG-rijk VLDL-deeltje te beïnvloeden of dat galzouten VLDL secretie remmen onafhankelijk van dit proces. De effecten van het galzout taurocholaat op secretie van een lipidenvrij, verkort apoB peptide of van apoB als onderdeel van TG-rijk VLDL, werden bestudeerd in de dubbelgetransfecteerde McA-RH7777 hepatoma cellijn. Deze cellijn bracht of het c-terminaal verkorte humaan apoB18 (in lipidenvrije vorm uitgescheiden) tot expressie of het volledige humaan apoB100 (als VLDL uitgescheiden), maar ook de Ntcp galzouttransporter (van rat origine). De resultaten van dit onderzoek tonen aan dat taurocholaat niet alleen de secretie van humaan apoB100 remt maar ook de secretie van het verkorte, lipidenvrije apoB18 peptide. De remmende werking van galzouten op VLDL secretie *in vitro* blijkt niet gebaseerd te zijn op verstoring van het lipideringsproces van apoB tot een TG-rijk VLDL deeltje. Remming van totale cellulaire eiwitafbraak via de proteosomale afbraakroute kon in taurocholaat-behandelde cellen de verlaagde apoB secretie niet opheffen of de verhoogde intracellulaire apoB afbraak voorkomen. Dit wijst erop dat een verhoogde apoB afbraak via de proteosomale route niet de primaire oorzaak is van de geremde apoB secretie. De uitkomsten van dit onderzoek leveren bewijs voor het bestaan van een nieuw, onbekend mechanisme via welke galzouten de secretie van apolipoprotein B remmen waar zeer waarschijnlijk het N-terminale gedeelte van apoB bij betrokken is.

De onderzoeken beschreven in dit proefschrift tonen aan dat galzouten effecten hebben op VLDL productie via verschillende routes die voornamelijk *onafhankelijk* zijn van transcriptionele regulatie van genen betrokken bij VLDL metabolisme. Onder fysiologische omstandigheden zijn de galzout-gemedieerde effecten op VLDL productie *in vivo* relatief klein. LXR en FXR zijn zeker betrokken bij lipoproteïnenproductie door de lever. Toch zijn beiden niet het voornaamste aangrijpingspunt van galzout-gemedieerde effecten op hepatische VLDL productie. De onderzoeken in dit proefschrift geven nieuwe informatie over de effecten van galzouten en hun tussenproducten op de vorming en productie van TG-rijke lipoproteïnen, maar impliceren tegelijkertijd dat meer onderzoek gedaan moet worden om de relatie tussen galzoutmetabolisme en lipoproteïenmetabolisme verder in kaart te brengen.

