

University of Groningen

## Hepatic peroxisome function in health and disease

Pellicoro, Antonella

**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:*

2008

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

*Citation for published version (APA):*

Pellicoro, A. (2008). *Hepatic peroxisome function in health and disease*. 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.*

## Samevatting

Peroxisomen zijn organellen die in nagenoeg alle eukaryote organismen voorkomen. Zij vervullen vele verschillende functies, afhankelijk van het cel type en de omstandigheden. Een kenmerk dat alle peroxisomen met elkaar gemeen hebben is de aanwezigheid van enzymen (oxidases) die waterstofperoxide ( $H_2O_2$ ) produceren als bijproduct van hun voornaamste metabole activiteit. Om te voorkomen dat deze potentieel toxische verbinding cellulaire componenten beschadigt, bevatten peroxisomen ook catalase wat het  $H_2O_2$  omzet in onschadelijk  $H_2O$  en  $O_2$ . Ondanks de grote diversiteit in metabole functies in peroxisomen, is het proces van de vorming van deze organellen (peroxisoom biogenese) sterk geconserveerd in de verschillende cel typen en organismen. Peroxisoom biogenese omvat de import van peroxisomale matrix eiwitten, membraan biogenese, peroxisoom proliferatie en overerving. De eiwitten die betrokken zijn bij de peroxisoom biogenese worden peroxins genoemd en worden met het acroniem *PEX#* afgekort voor de genen en met *Pex#p* voor de eiwitten. Het # is een nummer dat de volgorde van ontdekking weergeeft. Momenteel zijn er meer dan 30 peroxins geïdentificeerd, waarvan 14 humane orthologen bekend zijn.

Peroxisomen zijn belangrijke organellen. Als ze slecht functioneren of zelfs afwezig zijn worden metabole processen verstoord en leidt dit tot een progressieve verslechtering van weefsels en organen. Peroxisomale aandoeningen worden in het algemeen verdeeld in aandoeningen die het gevolg zijn van een slecht/niet functionerend peroxisomaal enzym en afwijkingen die leiden tot defecten in het vormen van het hele organel (peroxisomale biogenese afwijkingen; PBD's). Deze laatste worden veroorzaakt door mutaties in *PEX* genen en leiden tot een spectrum ziektes genaamd Zellweger Syndroom spectrum (ZSS), wat onder andere het syndroom van Zellweger, Neonatale Adrenoleukodystrofie (N-ALD) en de infantiele vorm van de ziekte van Refsum (IRD) omvat. De eerste symptomen van de aandoeningen zijn zichtbaar bij of vlak na de geboorte. Gemeenschappelijke klinische kenmerken van deze ziektes zijn afwijkende gelaatstrekken, vertraagde verstandelijke ontwikkeling, verschillende afwijkingen in de ontwikkeling van de hersenen, onvoldoende en afnemend gezichtsvermogen, spierzwakte en een vergrote en afwijkende functie van de lever waardoor geelzucht kan ontstaan.

In mens en dier zijn peroxisomen vooral talrijk in de lever waar ze onder meer belangrijk zijn voor de vorming van galzouten. Galzout biosynthese is een uniek kenmerk van de lever en is essentieel voor zowel het behouden van een gezond cholesterol niveau als voor het opnemen van vet-oplosbare nutriënten en het uitscheiden van afvalstoffen. Galzouten worden gemaakt van cholesterol door middel van een complexe biosynthetische route waarbij tenminste 13 verschillende enzymen betrokken zijn. Deze enzymen zijn in tenminste twee verschillende galzout biosynthese routes actief, de klassieke en de alternatieve route. De klassieke route (ook wel neutrale route genoemd) begint met een enzymatische stap (CYP7A) in het ER, terwijl de alternatieve (oftewel zure) route begint (met CYP27A) in mitochondriën. Na een aantal opeenvolgende enzymatische stappen komen beide routes samen en de laatste stappen die leiden tot de primaire galzouten choline zuur (CA) en chenodeoxycholine zuur (CDCA) vinden plaats in peroxisomen. De laatste stap van de galzout synthese is de conjugatie van CA of CDCA met een aminozuur, ofwel glycine of taurine. Deze stap wordt gekatalyseerd door het enzym Galzuur-CoA:aminozuur N-acyltransferase (BAAT). Vervolgens worden de galzouten geëxporteerd van de lever naar het gal, waar ze na voedselopname vrijgegeven worden in de twaalfvingerige darm. In de dunne darm vervullen zij hun primaire functie, het in oplossing houden van vet-oplosbare nutriënten (vitamines en vetten) zodat deze door het lichaam kunnen worden opgenomen. De galzouten worden aan het einde van de dunne darm

ook zelf uit het darm lumen geabsorbeerd naar het bloed en worden terug naar de lever getransporteerd voor hergebruik. Tijdens hun passage door de darm kunnen de galzouten hun amino groep verliezen door de activiteit van darmbacteriën. Voor een efficiënte kringloop van de galzouten tussen de lever en de darm (enterohepatische kringloop) moeten de galzouten opnieuw geconjugeerd worden. BAAT is het enige enzym dat deze conjugatie kan uitvoeren. In voorgaande studies is beschreven dat BAAT voorkomt in zowel peroxisomen als in het cytoplasma van hepatocyten. Dit lijkt een logisch voor de essentiële activiteit van BAAT in zowel de galzout biosynthese en de enterohepatische kringloop. Echter, de hoeveelheden BAAT die aan het cytosol worden toegekend, kunnen ook een artefact zijn van de gebruikte experimentele technieken. Peroxisomen zijn namelijk zeer fragiele organellen. Tijdens cel fractionerings-studies kunnen ze gemakkelijk breken waarbij de vrijgekomen inhoud in cytosol fracties terecht komt. Aangezien BAAT een duidelijk signaal voor efficiënte sortering naar het peroxisoom bevat, hebben we ons gericht op het eenduidig vaststellen van de cellulaire lokalisatie van BAAT in menselijke en rat levercellen. Het uiteindelijke doel hiervan was om de rol van peroxisomen in de herconjugatie van galzouten tijdens de enterohepatische cyclus te bepalen.

Met behulp van digitonine-permeabilisatie experimenten en immunofluorescentie microscopie laten we in hoofdstuk 2 zien dat endogeen BAAT in ratten en humane hepatocyten co-lokaliseert met de peroxisomale merker catalase en dat er geen significante hoeveelheden van dit enzym in het cytosol aanwezig zijn. Bovendien leidt transiënte expressie van een GFP-gemerkte versie van zowel het humane als het rat BAAT tot een efficiënte accumulatie van deze eiwitten in peroxisomen van hepatocyten. Opmerkelijk is dat GFP-BAAT in het cytosol wordt gedetecteerd indien het tot expressie wordt gebracht in humane fibroblasten. Echter, in fysiologische omstandigheden komt BAAT niet tot expressie in dergelijke cellen. Het feit dat BAAT alleen aanwezig lijkt te zijn in peroxisomen van hepatocyten heeft belangrijke implicaties voor de rol van deze organellen in de galzout homeostase. De peroxisomale membraan moet niet alleen een galzout exporter bevatten (volgend op de laatste stap van de galzout synthese) maar ook een transporter voor de import van ongeconjugeerde galzouten die terugkeren van de darm naar de lever. Dit is een volledig nieuw aspect van de rol van peroxisomen in galzout homeostase. Dit gaf ons aanleiding om vervolgens te zoeken naar mogelijke kandidaat eiwitten die betrokken kunnen zijn in het heen en weer transporteren gal door de peroxisomale membraan.

In hoofdstuk 3 onderzoeken we de mogelijkheid dat eiwitten die een hoge mate van overeenkomst met bekende galzout transporters vertonen, misschien diezelfde activiteit in de peroxisomale membraan uitvoeren. Het natrium-taurocholaat cotransporterende polypeptide (NTCP/SLC10A1) in de lever en de darm-specifieke apicale natrium-afhankelijke galzuur transporter (ASBT/SLC10A2) zijn sterk homologe galzout transporters. NTCP importeert galzouten vanuit het bloed in hepatocyten en ASBT importeert galzouten vanuit het darm lumen in enterocyten. Bij het screenen van het humane genoom, hebben we 4 “nieuwe” genen gevonden die een grote mate van overeenkomst vertonen met deze 2 galzout transporters. Deze 6 genen maken onderdeel uit van de Solute carrier 10A (SLC10A) familie van natrium-afhankelijke galzout transporters. Wij hebben de mate van homologie geanalyseerd tussen de SLC10A familie leden, de genomische organisatie van de SLC10A genen, hun hydrofobe profielen en hun weefsel-specifieke expressie patronen. Een van de leden trok onze aandacht, namelijk SLC10A5. SLC10A5 komt in het bijzonder tot expressie in organen van het spijsverterings kanaal, met de hoogste expressie in de lever. SLC10A5 lijkt in de lever voornamelijk tot expressie te komen in hepatocyten. Als zodanig, vertoont het expressie

profiel van SLC10A5 in de mens, muis en rat, zeer veel overeenkomst met dat van de transcriptie factor Farnesoide X Receptor (FXR) die de galzout homeostase reguleert. Sterker nog, de expressie van humaan SLC10A5 wordt gereguleerd door FXR, wat suggereert dat SLC10A5 een rol zou kunnen spelen in de galzout homeostase. Helaas vertoonden de antilichamen die we hebben opgewekt tegen SLC10A5 geen specifieke binding met dit eiwit en liet GFP-gemarkeerd SLC10A5 geen uniforme subcellulaire locatie in HepG2 cellen zien. De subcellulaire locatie van SLC10A5, zijn substraat specificiteit en de mogelijke rol in de galzout homeostase zullen dus nog vastgesteld moeten worden.

Onze aanpak van het analyseren van homologen van bekende galzout transporters zou gecombineerd kunnen worden met het isoleren van de galzout transport activiteit uit peroxisomale membranen om uiteindelijk de intracellulaire galzout transporters te identificeren.

De peroxisomale membraan bevat een verscheidenheid aan integrale en geassocieerde eiwitten die een functie vervullen in het transporteren van substraten en metabolieten (bijvoorbeeld de galzouten) of die een rol spelen in de vorming van het organel. In hoofdstuk 4 hebben we de mogelijke associatie van peroxisomale membraan eiwitten (PMP's) met specifieke lipide microdomeinen in de membraan, algemeen bekend als lipid rafts, bestudeerd. Lipid rafts zijn verrijkt in cholesterol. Ze komen voor een in cel/plasmamembranen en zijn ook gevonden in membranen van verschillende organellen, maar nog niet in de peroxisomale membraan. Bepaalde zeep-achtige verbindingen (detergentia) kunnen gebruikt worden om de cellulaire membraan op te lossen zodat de eiwitcomponenten vrij komen. Lipid rafts worden echter gekenmerkt door hun hoge resistentie tegen deze zeep-oplosbaarheid. Lipid rafts kunnen tevens onderverdeeld worden door het gebruik van verschillende detergentia, zoals Triton X-100 en Lubrol WX. Lipid rafts reguleren de sortering en activiteit van membraan eiwitten, Aangezien ze nog niet eerder in de peroxisomale membraan aangetoond zijn, hebben wij ons gericht op het vast stellen of ze hierin voorkomen en of ze de sortering van peroxisomale substraat transporters reguleren. We hebben ons gericht op 2 sterk homologe transporters van de ATP-bindings cassette (ABC) transporter familie, het adrenoleukodystrofie eiwit (ALDP/ABCD1) en het 70 kDa peroxisomale membraan eiwit (PMP70/ABCD3). Daarnaast hebben we twee peroxins, Pex13p en Pex14p, meegenomen waarvan bekend is dat ze een fysieke interactie met elkaar ondergaan wat belangrijk is voor de import van peroxisomale matrix eiwitten. PMP70 en Pex14p vertonen de meest sterke associatie met lipid rafts. Zowel Triton X-100 en Lubrol WX kunnen deze eiwitten niet uit de membraan oplossen. ALDP is geassocieerd met Lubrol WX-resistente lipid rafts, maar wordt volledig geëxtraheerd met Triton X-100. Pex13p daarentegen vertoont geen enkele associatie met lipid rafts. Verlaging van de hoeveelheid cholesterol in de cel leidt tot dissociatie van alle PMP's van de lipid rafts. Belangrijk daarbij is dat het ook leidt tot ALDP dan ook niet meer normaal naar de peroxisoom toe gaat. Met andere woorden: lipid rafts zijn belangrijk voor de normale peroxisomale targeting van ALDP. Deze observaties geven aanleiding tot belangrijk vervolg onderzoek, bijvoorbeeld: waar en op wat voor manier vindt vorming van peroxisomale lipid rafts plaats en wat is hun rol in de functie en vorming van peroxisomen?

Zoals in de inleiding al beschreven, bevatten peroxisomen catalase om het lokaal-geproduceerde  $H_2O_2$  onschadelijk te maken. De lever bevat heel veel catalase, wat suggereert dat dit een belangrijke functie is in dit orgaan. De lever is inderdaad een metabool sterk actief orgaan dat continu wordt blootgesteld aan grote hoeveelheden oxidanten, zelfs onder normale omstandigheden. Naast catalase bevatten hepatocyten ook een aantal andere enzymatische en niet-enzymatische anti-oxidanten, zoals superoxide dismutases (SOD's), glutathion peroxidases

(GPX's), glutathion (GSH), vitamine A, C en E, en  $\beta$ -caroteen. Catalase en GPX's zorgen voor de verwijdering van  $H_2O_2$ . Oxidatieve stress is echter ook een veel voorkomende conditie bij ziektes van de lever. Vele voorgaande studies hebben de rol van catalase tijdens oxidatieve stress-gerelateerde aandoeningen onderzocht. De peroxisomale lokalisatie wordt daarbij normaal gesproken niet beschouwd als een factor die effect kan hebben op de rol van dit anti-oxidant enzym. In hoofdstuk 5 hebben we de rol van catalase expressie en lokalisatie bij de bescherming van lever cellen tegen oxidatieve stress bestudeerd. We vonden dat in patiënten met acute ontsteking van de lever (hepatitis), catalase in het cytosol van hepatocyten accumuleert. Enerzijds kan dit als een nadelige situatie beschouwd worden aangezien het peroxisoom dan een overmatige hoeveelheid  $H_2O_2$  stress produceert. Anderzijds zou catalase betrokken kunnen zijn bij de cellulaire bescherming tegen oxidatieve stress voortkomend uit andere bronnen dan het peroxisoom. Om deze mogelijkheid te onderzoeken hebben we humane HepG2 cellen blootgesteld aan verschillende concentraties  $H_2O_2$  waarbij de gebruikte cellen de catalase expressie, activiteit en/of subcellulaire lokalisatie kunstmatig is aangepast. We ontdekten dat het verlagen van de catalase expressie of activiteit de HepG2 cellen sterk gevoelig maakt voor  $H_2O_2$ -geïnduceerde necrotische cel dood. Daarentegen leidt overexpressie van catalase in deze cellen tot bescherming tegen  $H_2O_2$ -geïnduceerde necrose. Deze resultaten tonen aan dat peroxisomaal catalase niet alleen beschermd tegen  $H_2O_2$  stress geproduceerd in peroxisomen maar ook tegen  $H_2O_2$  stress afkomstig van niet-peroxisomale bronnen. Verrassend genoeg vonden we dat HepG2 cellen veel beter beschermd waren tegen  $H_2O_2$ -geïnduceerde cel sterfte indien catalase in het cytosol aanwezig ten opzichte van de normale lokalisatie in peroxisomen. Dus de cytosolische accumulatie van catalase tijdens hepatitis zorgt voor een verhoogde bescherming van hepatocyten tegen oxidatieve stress tijdens deze pathologische omstandigheden. Naast het verhogen van de expressie van catalase op mRNA niveau en op eiwit niveau, zou cellulaire herverdeling van dit anti-oxidant enzym een derde mechanisme kunnen zijn waarmee hepatocyten zich beschermen tegen oxidatieve stress tijdens pathologische omstandigheden. Het is daarom hoogst relevant om onderzoek te gaan doen naar het cellulaire mechanisme waarmee catalase cytosolisch wordt en of dit ook in andere oxidatieve stress-gerelateerde (lever) aandoeningen voorkomt.

Samenvattend kunnen we concluderen dat dit proefschrift nieuwe, interessante kenmerken van peroxisomen in de lever beschrijft, zowel in het gezonde lichaam als tijdens ziekte. Peroxisomen spelen een veel belangrijkere rol in de galzout homeostase dan tot nu toe bekend was. Vervolg onderzoek moet aantonen welke peroxisomale membraaneiwitten hierbij een rol spelen. De peroxisomale membraan bevat lipid rafts en deze zorgen ervoor dat bepaalde eiwitten (in ieder geval ALDP) in de peroxisomale membraan terecht komen. X chromosoom-gebonden adrenoleukodystrofie wordt veroorzaakt door het slecht functioneren van ALDP en lipid rafts zouden een rol kunnen spelen bij het ontstaan van deze aandoening. Catalase blijkt een "mobiel" enzym te zijn die tijdens ziekte vooral in het cytosol aanwezig is. Deze (tijdelijke) subcellulaire herverdeling van catalase geeft de levercel extra bescherming tegen oxidatieve stress tijdens een ontsteking van de lever.