

Proteomic-based discovery of nutrient-gene regulations: implications for gut health

Citation for published version (APA):

Lenaerts, K. (2007). *Proteomic-based discovery of nutrient-gene regulations: implications for gut health*. Maastricht University Press.

Document status and date:

Published: 01/01/2007

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SAMENVATTING

SAMENVATTING

De voedingsstoffen die gebruikt worden voor de stofwisseling in het menselijk lichaam worden gehaald uit de verterings- en resorptieprocessen van voedsel in het maagdarmsstelsel. Een goede conditie van de darmcellen die hiervoor verantwoordelijk zijn, ook wel resorberende epitheelcellen genoemd, is noodzakelijk voor het behoud van een optimale voedingsstatus. Daarbij komt dat de mucosa van de dunne darm rechtstreeks wordt blootgesteld aan de uitwendige omgeving, waarin mogelijk gevaarlijke stoffen aanwezig zijn. De darm heeft dus een dubbele functie, namelijk het verteren en opnemen van voldoende nutriënten en het vormen van een barrière die essentieel is voor het immuunsysteem van de gastheer. Kritisch zieke patiënten vertonen veranderingen in hun darmfunctie, zoals een verhoging van de permeabiliteit van het darmepitheel en een toename van schade of atrofie van de darmvlokken. Daarom bestaat er interesse in voedingsfactoren die de darmintegriteit en -functie kunnen ondersteunen in zulke omstandigheden.

De aminozuren glutamine en arginine worden conditioneel essentieel geacht bij patiënten die lijden aan katabole ziekten. Verschillende studies hebben aangetoond dat deze aminozuren mogelijk een gunstig effect hebben op het herstel van beschadigd darmepitheel en de integriteit van de darm in het algemeen. Er zijn echter meer studies nodig om de onderliggende moleculaire mechanismen en 'pathways' van het effect van deze aminozuren op de darmcellen te kunnen begrijpen. Om dit te onderzoeken werd er gebruik gemaakt van een *in vitro* model voor de darm, namelijk de humane coloncarcinoom cellijn Caco-2. In gedifferentieerde toestand vertonen de Caco-2 cellen zowel morfologische als functionele eigenschappen van de epitheelcellen van de darmvlokken. Ze vormen een aaneensluitende cellaag en vertonen een borstelzoom (microvilli) op hun apicale (\approx luminale) oppervlak waarmee verschillende verteringsenzymen geassocieerd zijn. Nadat deze cellen werden blootgesteld aan verschillende condities, werd hun proteoom, *i.e.* het geheel aan eiwitten dat op een bepaald moment in de cel aanwezig is, geanalyseerd. Dit werd meestal gedaan met behulp van tweedimensionale gelelektroforese (2-DE), dit is een techniek waarmee verschillen in eiwitexpressie tussen twee condities gedetecteerd kunnen worden. Dergelijke eiwitten worden vervolgens geïdentificeerd door middel van massaspectrometrie.

In hoofdstuk 2 werd het effect van glutamine op het proteoom van Caco-2 cellen onderzocht. Hierbij werd glutamine in een verschillende hoeveelheid toegevoegd aan het apicale dan wel basolaterale (\approx serosale) medium waaraan de cellen werden blootgesteld. Deze studie toonde aan dat een veranderde glutamineconcentratie niet in staat is het proteoom van Caco-2 cellen zichtbaar te veranderen. Er werd wel aangetoond dat glutamine opgenomen wordt door de Caco-2 cellen, en dat ze dit glutamine ook inbouwen in hun eiwitten tijdens de synthese, ongeacht via

welke zijde van de cellaag dit aminozuur wordt aangeboden. Echter, wanneer glutamine via de basolaterale zijde wordt aangeboden is de opname en inbouw in eiwitten groter dan wanneer glutamine via de apicale zijde wordt aangeboden. Dezelfde eiwitten worden gelabeld onafhankelijk van de zijde van blootstelling van het aminozuur, wat erop wijst dat het glutamine in dezelfde pool wordt opgenomen. Gerapporteerde verschillen tussen het effect van 'luminaal' en 'serosaal' glutamine kunnen dus niet verklaard worden door een verschillend stimulerend effect op de synthese van bepaalde eiwitten.

De glutamine synthetase activiteit is zeer laag in de epitheelcellen van de dunne darm *in vivo*, wat aangeeft dat de darmcellen afhankelijk zijn van exogeen glutamine voor hun voorziening. In tegenstelling tot normale darmcellen hebben Caco-2 cellen een grote capaciteit om glutamine aan te maken. Door het blokkeren van deze glutamineproductie lijken de Caco-2 cellen mogelijk meer op de normale darmcellen. Deze onderzoeksbenadering heeft geleid tot de ontdekking van eiwitten, waarvan het expressieniveau afhankelijk is van de hoeveelheid glutamine die beschikbaar is voor de cellen, zoals beschreven in hoofdstuk 3. Hierbij valt op te merken dat er geen verband bestaat tussen de verandering in eiwitexpressie en de mate waarin het eiwit in fysiologische omstandigheden nieuw wordt gesynthetiseerd. Vermits glutamine een aminozuur is dat vereist is voor de aanmaak van eiwitten, wijst dit feit erop dat deprivatie van glutamine niet uitsluitend een invloed heeft op de algemene eiwitsynthese, maar dat er een meer specifiek regelmechanisme speelt. Dit mechanisme is tot op heden niet bekend. Sommige gereguleerde eiwitten hebben mogelijk een gezondheidsbevorderend effect op de dunne darm. Een verlaagde expressie van deze eiwitten kan dus mede verantwoordelijk zijn voor de negatieve effecten die de darm ondervindt bij een tekort aan glutamine. Een voorbeeld van een dergelijk eiwit is ornithine aminotransferase (OAT), een enzym dat betrokken is bij de omzetting van glutamine naar ornithine. Ornithine is een precursor voor polyamines, welke moleculen zijn die een trofisch effect hebben op de darmmucosa en die belangrijk zijn voor het behoud van de integriteit van de epitheellaag van de darm. Dit resultaat wordt bewerkstelligd door een effect op celproliferatie, celdifferentiatie en migratie. Meerdere eiwitten die veranderd tot expressie komen onder invloed van de beschikbaarheid van glutamine, werden gedetecteerd, waarvan plasma retinolbindend eiwit, apolipoproteïne A-I (apoA-I), mitochondrieel 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA en acyl-CoA-synthase 5 eveneens een gunstig effect kunnen hebben op de darm.

Hoofdstuk 4 behandelt voornamelijk het effect van een tekort aan het aminozuur arginine op het proteoom van prolifererende Caco-2 cellen. In deze studie is in eerste instantie gekozen voor cellen die zich nog delen, aangezien arginine het proces van darmherstel gunstig beïnvloedt en proliferatie hierbij een belangrijke rol

speelt. De resultaten van de studie kwamen overeen met een dergelijke bevinding, aangezien vooral eiwitten met een rol in proliferatie, apoptose en de 'heat shock' respons veranderd tot expressie kwamen bij een argininetekort in de darmcellen. Deze veranderingen in eiwitexpressie werden tenietgedaan nadat de cellen opnieuw werden blootgesteld aan arginine of citrulline. De bevinding dat citrulline een dergelijke respons vertoont, suggereert dat dit aminozuur arginine (gedeeltelijk) kan vervangen. Daar gedacht wordt dat supplementatie met citrulline een betere therapie is dan supplementatie met arginine bij een tekort aan dat laatste, kan voorgaande bevinding klinische implicaties hebben. In tegenstelling tot arginine kan citrulline namelijk de lever passeren zonder afgebroken te worden en wordt het vervolgens omgezet tot arginine in de nieren. De studie in hoofdstuk 4 laat zien dat dit geen negatieve effecten voor de darmcellen teweegbrengt op het vlak van eiwitexpressie en celproliferatie. Ook gedifferentieerde Caco-2 cellen werden blootgesteld aan medium zonder arginine en vervolgens werd het proteoom vergeleken met dat van cellen die wel arginine via het medium kregen. Slechts weinig eiwitten vertoonden een gelijkaardige respons ten gevolge van een argininetekort in prolifererende en gedifferentieerde Caco-2 cellen. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat in deze cellen andere processen actief zijn die karakteristiek zijn voor het stadium waarin ze zich bevinden.

Het effect van glutamine en arginine op Caco-2 cellen werd bestudeerd in een vergelijkbare setting, zoals beschreven in hoofdstuk 3 en 4. Het afzonderlijk weghalen van glutamine en arginine uit het medium van deze cellen gedurende een periode van 24 uur leidt tot een stijging van de expressie van reticulocalbine-1 en een daling van de apoA-I-expressie. Dat laatste suggereert dat er voldoende glutamine en arginine voorhanden moet zijn in darmcellen, willen ze een normale apoA-I-productie bewerkstelligen. ApoA-I is het belangrijkste structurele eiwit van de anti-atherogene HDL-lipoproteïnen, ook wel de goede cholesterol genoemd. De impact van de toegenomen reticulocalbine-1-expressie ten gevolge van een tekort aan glutamine of arginine is nog onduidelijk. Reticulocalbine is gelokaliseerd in het lumen van het endoplasmatisch reticulum, en zou mogelijk een rol hebben bij de synthese en processing van eiwitten.

Naast de interesse in voedingsfactoren die een gunstig effect hebben op de darm, richt dit proefschrift zich op de vroege en late veranderingen in de darm ten gevolge van vasten. Het beter begrijpen van de moleculaire adaptatie van de darmen, die veroorzaakt wordt door een gebrek aan voeding, kan uiteindelijk leiden tot een verbetering van de voedingsondersteuning bij patiënten die lijden aan pathologieën welke geassocieerd zijn met ondervoeding. Om deze onderzoeksvraag te beantwoorden werden muizen gehongerd voor 12, 24 en 72 uur waarna hun dunne darmen werden onderzocht op eiwitniveau. De resultaten, beschreven in hoofdstuk 5, tonen aan dat het expressiepatroon van het

darmweefsel significant verandert ten gevolge van hongeren. Op basis van de verandering in eiwitexpressie werden processen als glucose- en energiemetabolisme geclassificeerd als verlaagd na 12 uur vasten. Dit is waarschijnlijk een directe reactie op de verminderde aanvoer van voedsel. Na 24 uur vasten kwamen twee elongatiefactoren, die een belangrijke rol spelen bij het proces van eiwitsynthese, verminderd tot expressie. Ondanks dit remmende effect op de algemene eiwitsynthese werden de expressieniveaus van reg I, reg II, glutathionperoxidase 3 en koolzuuranhydrase 3 opgereguleerd. Verondersteld wordt dat deze eiwitten een beschermende rol hebben in de darmcellen. Vasten gedurende 24 uur resulteerde in een verlaging van de expressie van OAT, vergelijkbaar als bij deprivatie van glutamine voor 24 uur in Caco-2 cellen. Verhoogde expressie van ezrine werd gedetecteerd na 72 uur vasten en dit duidt op een poging de villusfunctie te handhaven bij een dergelijke depletie van de energiereserves.

Twee veelgebruikte celmodellen voor het epitheelweefsel van de humane dunne en dikke darm zijn Caco-2 en HT-29 cellen, zo ook in dit proefschrift. Deze en vele andere cellijnen zijn van tumorale oorsprong, wat impliceert dat het metabolisme van de cellen veranderd is in vergelijking met de fysiologische *in vivo* situatie. Het metabolisme van een cel wordt bepaald door de expressie en activiteit van meerdere genproducten. Daarom werden deze celmodellen geëvalueerd op het niveau van eiwitexpressie in hoofdstuk 6. Om dit te realiseren werden de eiwitprofielen van deze humane *in vitro* modellen vergeleken met de eiwitprofielen van epitheelcellen afkomstig van schraapsels van de dunne en de dikke darm. Twee negatieve controles werden toegevoegd aan de studie, namelijk de levercellijn Hep G2 en de spiercellijn TE 671, beiden afkomstig van humaan tumorweefsel. Statistische analyses zoals 'principal component analysis' en 'hierarchical clustering' werden toegepast op de eiwitdata en onthulden dat de eiwitexpressie van de schraapsels van het darmepitheel behoorlijk verschilde van die van de darmcellijnen en van cellijnen in het algemeen. Typische eiwitten die hoger tot expressie kwamen in de schraapsels zijn hemoglobine alfa en bèta, serumalbumine en transthyretine. Deze eiwitten zijn hoogstwaarschijnlijk afkomstig van bloed, wat erop wijst dat het, ondanks het zorgvuldig schrappen, vrij moeilijk is om zuivere isolaten van epitheelcellen te verkrijgen. Meteen is ook het voordeel van cellijnen kracht bijgezet, daar zulke celculturen uit een homogene celpopulatie bestaan. Meer eiwitten die verschillen in expressie tussen *in vitro* celculturen en de epitheelschraapsels, werden gedetecteerd. Vooral eiwitten, die de tumorale oorsprong van de cellijnen en hun aanpassing aan kweekcondities reflecteren, behoren tot deze groep. Ondanks bovenstaande bevindingen vertonen de 2-D-patronen van Caco-2 cellen en epitheelcellen van de dunne darm veel overlap. Daarenboven heeft de studie geleid tot de identificatie van enkele eiwitmarkers, zoals OAT, in Caco-2 cellen die karakteristiek lijken voor het fenotype van het

epitheel van de dunne darm. Algemeen beschouwd tonen de data, beschreven in hoofdstuk 6, aan dat de Caco-2 cellen bruikbaar zijn voor het vergroten van de kennis over het darmepitheel. Wel moet rekening gehouden worden met het feit dat het extrapoleren van zulke kennis, verkregen door middel van het gebruik van een celmodel, naar de humane *in vivo* situatie gecompliceerd is en stof voor verder onderzoek.

Concluderend demonstreert dit proefschrift de toepasbaarheid van proteomics-technologie in het voedingsonderzoek, daar nieuwe eiwitten en moleculaire 'pathways' werden gevonden die gereguleerd worden door de beschikbaarheid van bepaalde nutriënten. De geïdentificeerde nutriënt-genregulaties kunnen een verdere bijdrage leveren aan het begrijpen en onderbouwen van de behoefte van bepaalde nutriënten voor het handhaven en verbeteren van de darmgezondheid in de mens. Niettegenstaande is meer functioneel onderzoek vereist om het belang van de gereguleerde eiwitten in de darm kracht bij te zetten.