

VU Research Portal

Obesity and type 2 diabetes : a systems biology perspective of a molecular mechanism

Ciapaite, J.

2007

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Ciapaite, J. (2007). *Obesity and type 2 diabetes : a systems biology perspective of a molecular mechanism*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

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

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.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Samenvatting

In dit proefschrift wordt onderzocht of remming van de mitochondriële Adenine Nucleotide Translocator (ANT) door in de cel aanwezige coenzym A esters van vetzuren met lange koolstofketens (LCAC) de oorzaak kan zijn van veel verschijnselen die optreden in insuline-ongevoelige toestanden zoals die optreden bij vetzucht en type 2 diabetes, en op die manier het verband kan verklaren tussen vetzucht en type 2 diabetes. ANT is een enzym uit de mitochondriële binnenmembraan dat de uitwisseling katalyseert tussen ATP in de mitochondriële matrix en ADP uit het celsap. Daarom verwachten we dat remming van dit enzym tijdens ATP productie via oxidatieve fosforylering leidt tot een tekort aan ATP in het celsap, met als gevolg een hogere vormingssnelheid van adenosine buiten de cel. Verder zal de geringere beschikbaarheid van ADP in de matrix er toe leiden dat ATP synthese door de ATP synthase vermindert, zodat de mitochondriële membraanpotentialiaal ($\Delta\psi$) toeneemt. Een hoge $\Delta\psi$ kan leiden tot een stimulering van de vorming van reactieve vormen van zuurstof (ROS). Naar verwachting zullen al deze effecten van remming van de ANT leiden tot het gebrekkige functioneren van cellen dat wordt gezien bij insuline-ongevoelige toestanden (zoals die onder andere optreden bij vetzucht en type 2 diabetes).

Type 2 diabetes is een ziekte die wordt gekenmerkt door een slechte glucose homeostase (het constant blijven van de hoeveelheid glucose in het bloed), die kan worden veroorzaakt zowel door problemen met de insulineproductie door β -cellen in de alvelesklier, als door problemen met de uitwerking van insuline op de overige weefsels. De ziekte is een wereldwijd probleem aan het worden. Slechte werking van de mitochondriën komt naar voren als een belangrijke factor bij het slechte functioneren van cellen zoals dat optreedt bij insuline-ongevoelige toestanden. In veel gevallen is gevonden dat overgewicht en vetzucht ertoe leiden dat de ziekte eerder inzet, en vervolgens een ernstiger verloop kent. De precieze rol die toegenomen vervetting speelt bij het veroorzaken van type 2 diabetes is nog niet bekend. Ideeën over de rol van verschillende uit het vetweefsel afkomstige moleculen, zoals cytokinen, hormonen en vetzuren leiden tot verschillende voorstellen voor moleculaire mechanismen, die intensief worden bestudeerd. Door het grote aantal betrokken genen, enzymen en metabole routes, is de traditionele, reductionistische moleculair-biologische aanpak van onderzoek van "systeemziektes" zoals vetzucht en type 2 diabetes vaak niet effectief. Het begrip van onderliggende moleculaire mechanismen, en het identificeren van kansrijke aanknopingspunten voor therapie is dan ook teleurstellend. In dit proefschrift wordt er van uit gegaan dat vetzucht en type 2 diabetes inderdaad te zien zijn als afwijkingen van het biologische systeem als geheel (systeem ziektes), en dat het hele netwerk van energie metabolisme in de mens is aangetast. Het zoeken naar een enkelvoudige moleculaire oorzaak voor deze ziektes is dus niet erg nuttig; we moeten ons vooral richten op de dynamiek van de regulatie (die meervoudige bronnen kan hebben) door deze netwerken. Dat betekent niet dat moleculaire mechanismen onbelangrijk zijn, maar dat we nadrukkelijk ook meervoudige oorzaken en hun gevolgen moeten bestuderen. Binnen dat kader is dit onderzoek gericht op de meervoudige gevolgen van een enkele moleculaire gebeurtenis waarvan we voorstellen dat die belangrijk is voor het verband tussen vetzucht en type 2 diabetes: de remming van ANT door LCAC.

Hoofdstuk 1 bevat een algemene inleiding. Hierin wordt de gebrekkige homeostase van glucose, het belangrijkste kenmerk van type 2 diabetes, besproken in verband met toegenomen vervetting. De werkhypothese over hoe remming van ANT door LCAC leidt tot slechte werking van de cellen wordt uiteengezet. Omdat het meeste werk in dit proefschrift met geïsoleerde

mitochondriën is uitgevoerd, wordt een gedeelte van het mitochondriële metabolisme (oxidatieve fosforylering, en productie van ROS) in meer detail beschreven. Verder wordt Metabole Controle Analyse (MCA) geïntroduceerd als hulpmiddel om de controle van de fluxen door metabole routes en van metabolietconcentraties door onderdelen van die routes kwantitatief te beschrijven.

In Hoofdstukken 2 en 3 worden de effecten op oxidatieve fosforylering beschreven van twee LCAC's, de Coenzym A esters van palmitinezuur (palmitoyl-CoA, C16:0) en oliezuur (oleoyl-CoA, C18:1). Dit onderzoek werd uitgevoerd in een modelsysteem dat bestond uit geïsoleerde rattenlever mitochondriën, die òf barnsteenzuur (succinaat), òf een NADH-producerende combinatie van glutaminezuur (glutamaat) en appelzuur (malaat) verademden. Om aangrijpingspunten van LCAC op de enzymen van de oxidatieve fosforylering te identificeren via analyse van modulaire kinetiek werd het systeem op twee verschillende manieren in modules verdeeld: (i) drie functionele modules (substraat oxidatie, fosforylering en protonlek) met $\Delta\psi$ als verbindende schakel; (ii) twee functionele modules (ATP-producerend en ATP-verbruikend), met intramitochondriël ATP als verbindende schakel (uitgedrukt als ATP/ADP verhouding, of als de verhouding $\text{ATP}/(\text{ATP} + \text{ADP})$). Met deze benadering werd gevonden dat beide LCAC de ANT remden, en niet of nauwelijks de andere componenten van de oxidatieve fosforylering. In overeenstemming met eerdere waarnemingen, was het effect van het onverzadigde oleoyl-CoA zwakker dan dat van het verzadigde palmitoyl-CoA. We stelden vervolgens vast dat hoewel de LCAC's slechts één enkel moleculair aangrijpingspunt hadden, hierdoor (geheel in overeenstemming met het gezichtspunt van de systeem biologie) een groot aantal steady-state eigenschappen van de mitochondriën veranderden. Het betreft lagere zuurstofopname- en fosforyleringfluxen, een hogere $\Delta\psi$, een lager ATP-gehalte in het celsap en een hoger ATP-gehalte in de mitochondriële matrix. De grootte van deze veranderingen was afhankelijk van de omstandigheden waaronder de mitochondriën hun werk deden.

Nadat gebleken was dat in overeenstemming met de hypothese remming van de ANT leidt tot een lagere hoeveelheid ATP buiten de mitochondriën en een hogere $\Delta\psi$, werd onderzocht in hoeverre dat leidt tot een toename van AMP vorming buiten de mitochondriën, en een stimulering van ROS productie (Hoofdstuk 3). Een berekening van de te verwachten hoeveelheid AMP als functie van de ATP/ADP verhouding buiten de mitochondriën liet zien dat de hoeveelheid AMP toeneemt als ATP/ADP afneemt. Dit effect is sterker naarmate ATP/ADP lager is. In Hoofdstuk 2 werd deze trend inderdaad experimenteel gevonden in de totale hoeveelheid AMP. Hieruit volgt dat het effect van LCAC op AMP productie afhangt van de energietoestand van de cel. Vervolgens werd aangetoond dat palmitoyl-CoA de vorming van H_2O_2 (één van de ROS) stimuleert in mitochondriën die succinaat verademen onder omstandigheden waarbij veel ATP wordt gevormd (state 3). Dit proces hangt af van $\Delta\psi$, en wordt grotendeels veroorzaakt door remming van de ANT.

De relatieve bijdrage van een bepaald enzym aan de controle van de flux door een metabole route en aan de controle van metabolietconcentraties is één van de factoren die bepalen in hoeverre de remming van dat enzym de functie van die route in gevaar brengt. Om die reden wilden we weten in hoeverre de ANT fluxen, metaboliet concentraties, elektrische- en redoxpotentialen controleert, en in hoeverre die controle verandert onder invloed van palmitoyl-CoA. In het tweede deel van Hoofdstuk 3 wordt MCA gebruikt om die controle te kwantificeren. Voor de analyse van de metabole controle werd de oxidatieve fosforylering in zes modules verdeeld (coenzym Q-

Samenvatting

reducerende module, coenzym Q-oxiderende module, proton lek, ATP synthase, ANT en hexokinase), met vier verbindende schakels (de QH_2/Q verhouding, $\Delta\psi$ en de ATP/ADP verhoudingen in de mitochondriële matrix en buiten de mitochondriën). Hierdoor was het mogelijk om niet alleen de controle op fluxen en concentraties door de ANT, maar ook door de andere 5 modules te bepalen. Analyse van de experimentele gegevens toonde aan dat controle van de zuurstofopnameflux en de fosforyleringsflux verdeeld is tussen alle componenten van het systeem, terwijl de reductiegraad van coenzym Q (QH_2/Q ratio), $\Delta\psi$, en de ATP/ADP verhoudingen binnen en buiten de mitochondriën voornamelijk worden bepaald door de directe producent (positieve controle) en directe verbruiker (negatieve controle). De ANT draagt bij aan de controle van alle onderzochte eigenschappen van de mitochondriële oxidatieve fosforylering, maar vooral aan de controle van de ATP/ADP verhoudingen binnen en buiten de mitochondriën. In de meeste gevallen verhoogt palmitoyl-CoA de absolute grootte van de controle door ANT, behalve bij de controle van de QH_2/Q verhouding en van $\Delta\psi$, waar het effect verwaarloosbaar was. De gegevens in Hoofdstukken 2 en 3 laten zien dat de mate waarin palmitoyl-CoA invloed heeft op de mitochondriële eigenschappen grotendeels verklaard kan worden uit de mate waarin de ANT controle uitoefent over deze eigenschappen.

Slecht functioneren van de mitochondriën komt steeds meer naar voren als een factor bij insuline resistentie. Insuline resistentie is vaak een gevolg van een overvloedige toevoer van vetten. In Hoofdstuk 4 wordt onderzocht wat de gevolgen zijn voor de mitochondriële werking in rattenlever van een langdurig vetrijk dieet (HFD) ten opzichte van een vetarm dieet (LFD). Er werd gevonden dat 7 weken HFD tot gevolg had dat er in de lever een opeenstapeling van LCAC werd waargenomen, naast oxidatieve schade (weerspiegeld door opeenstapeling van de "markeerder" N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine). Er werden echter geen verschillen gevonden in het aantal kopieën van het mitochondriëel DNA, of in de hoeveelheden van de ademhalingsketen componenten coenzym Q, cytochroom b en cytochroom a + a₃ (cytochroom c + c₁ is een uitzondering: hier werd een kleine, doch significante toename gevonden). Ook waren de steady-state waarden van zuurstofopname- en fosforyleringsfluxen, $\Delta\psi$, de ATP/ADP verhoudingen binnen en buiten de mitochondriën en de reductiegraad van coenzym Q vergelijkbaar in succinaat verademende, actief fosforylerende (state 3) mitochondriën uit de levers van HFD of LFD ratten. We pasten analyse van modulaire kinetiek toe om na te gaan of dit gebrek aan veranderingen in de steady-state waarden van de mitochondriële eigenschappen het gevolg kan zijn van een aanpassingsmechanisme ten gevolge van het HFD. Een dergelijk mechanisme zou omgevingsveranderingen kunnen compenseren door de expressie van enzymen of de kinetiek binnen het systeem zodanig aan te passen dat eigenschappen zoals ATP niveaus en $\Delta\psi$ onveranderd blijven. De analyse bracht aan het licht dat dergelijke aanpassingen van de kinetiek van de modules van de oxidatieve fosforylering niet optreden na HFD voeding, zodat er geen homeostase is op dit niveau. Een tweede conclusie is dat controle door de ANT niet verandert tengevolge van HFD voeding, hetgeen suggereert dat LCAC hun effect ook uitoefenen onder omstandigheden van overmatige vettoevoer.

Bij insuline resistentie, waarbij hoge niveaus van circulerende vetzuren voorkomen, wordt ook slecht functioneren van endotheelcellen vastgesteld. In Hoofdstuk 5 wordt het mechanisme onderzocht waarmee vetzuren de werking van endotheelcellen verstoren, waarbij met name de rol van remming van de ANT door LCAC in dat mechanisme wordt bekeken. We toonden aan dat

langdurige blootstelling van gekweekte menselijke navelstreng-ader endotheelcellen (HUVEC) aan hoge concentraties palmitinezuur (C16:0) of oliezuur (C18:1) leidt tot verhoging van het LCAC-gehalte in de cellen. Deze toename was voornamelijk in de gehalten van de LCAC's die overeenkwamen met de vetzuren waaraan de cellen waren blootgesteld. De toename werd vergezeld door een afname in de totale ATP/ADP verhouding in de cellen. Het is nog niet duidelijk of de eerste bevinding verantwoordelijk is voor de tweede via remming van de ANT door de LCAC. Een aanwijzing hiervoor is dat remming van de acyl-CoA synthase (door de remmer triacsin C) leidt tot een hogere totale ATP/ADP verhouding in de cellen. Echter, deze toename in totale ATP/ADP verhouding werd ook gevonden in controlecellen die niet met vetzuren waren geïncubeerd. De conclusie is dat remming van de acyl-CoA synthetase een complex effect heeft op de cel dat niet makkelijk is te duiden.

Palmitinezuur activeerde caspase-3 beter dan oliezuur. Dit effect van palmitinezuur werd gedeeltelijk verhinderd door de anti-oxidant α -tocoferol of de ceramide synthase remmer fumonisine B₁, en volledig door triacsin C. Dit alles geldt niet voor het effect van oliezuur. Verder hebben palmitinezuur en oliezuur verschillende effecten op cel proliferatie, activering van de kernfactor- κ B (NF- κ B) en expressie van adhesiefactoren. Het eerste proces was gevoeliger voor het verzadigde palmitinezuur, het laatste was gevoeliger voor het onverzadigde oliezuur. We vermoeden dat dit het gevolg is van verschillen tussen het metabolisme van verzadigde en onverzadigde vetzuren. Verzadigde vetzuren worden bij voorkeur omgezet in diacylglycerol en ceramide, stoffen die proliferatie, differentiatie en groei van cellen reguleren. De rol van ceramides in de door vetzuren veroorzaakte slechte werking van endotheelcellen kan worden onderzocht met behulp van een ceramide synthase remmer. Echter, vanwege de giftigheid van deze remmer fumonisine B₁ was dat niet mogelijk. Het is waarschijnlijk dat onverzadigde vetzuren bijdragen aan oxidatieve stress door oxidatie van hun dubbele bindingen. Dit alles tezamen laat zien dat, afhankelijk van het soort, de hoeveelheid of de duur van de blootstelling, vetzuren de werking van endotheelcellen beïnvloeden door activering van processen die optreden bij ontstekingen, of betrokken zijn bij geprogrammeerde celdood (apoptose).

Samenvattend, de in dit proefschrift beschreven resultaten laten zien dat in overeenstemming met de werkhypothese LCAC in geïsoleerde rattenlever mitochondriën de ANT remmen, hetgeen leidt tot een lager ATP niveau buiten de mitochondriën, en een hogere $\Delta\psi$. Dit leidt vervolgens tot verhoogde vorming ROS door de mitochondriën, en van extra-mitochondriëel AMP. Verder veroorzaakt langdurige blootstelling aan een vetrijk dieet ophoping van LCAC in rattenlever, zodat remming van de ANT door LCAC ook in intacte dieren op kan treden, met als gevolg dat we ook daar de effecten kunnen verwachten die we in geïsoleerde rattenlever mitochondriën hebben waargenomen. Dit des te meer omdat langdurige blootstelling aan een vetrijk dieet niet lijkt te leiden tot aanpassingen in de vorm van het aantal mitochondriën per cel, of stimulering van expressie van ANT en/of andere enzymen betrokken bij oxidatieve fosforylering. Net als in rattenlever, leidt blootstelling van menselijke endotheelcellen aan hoge concentratie vetzuren tot opeenhoping van LCAC en verlaging de totale ATP/ADP verhouding, hetgeen mogelijk duidt op remming van de ANT. Onze bevindingen ondersteunen dus de hypothese dat remming van de ANT door LCAC in ieder geval deels aan de basis ligt van de slechte werking van cellen die kenmerkend is voor insuline ongevoeligheid die optreedt bij vetzucht en type 2 diabetes. Meer in het algemeen laat dit werk zien hoe analyse van modulaire kinetiek en Metabole Controle

Samenvatting

Analyse toegepast kunnen worden om oorzaak-gevolg relaties bij systeemziektes zoals vetzucht en type 2 diabetes te onderzoeken.