



Doctoral Thesis

Expression and function of hepatocellular organic anion transport proteins in a rat model of chronic renal failure

Author(s):

Holzer, Barbara

Publication Date:

2006

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005215185> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Dissertation ETH Nr. 16652

Expression and Function of Hepatocellular Organic Anion Transport Proteins in a Rat Model of Chronic Renal Failure

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Sciences ETH

presented by

Barbara Holzer

Pharmacist (eidg. dipl. Apothekerin)
ETH Zürich

born January 12, 1976
citizen of Moosseedorf (BE)

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. G. Folkers, examiner
Prof. Dr. P.A. Schubiger, co-examiner
Prof. Dr. P.J. Meier, co-examiner
Prof. Dr. B. Stieger, co-examiner

2006

Summary

Increasing evidence suggests that chronic renal failure affects not only the renal elimination of drugs but also the hepatic excretion. These observations lead to the assumption that chronic renal failure affects the expression and/or function of transport systems involved in the hepatic clearance of bile acids, organic anions and drugs.

In rat liver, endogenous and exogenous organic anions are taken up into hepatocytes by the Na⁺-dependent bile acid transporter (Ntcp) and the Na⁺-independent organic anion transporters (Oatps). Both of these transport systems are localized at the basolateral membrane of hepatocytes. After uptake these substances are either metabolized or eliminated in an unchanged manner. Excretion from hepatocytes is mediated by basolateral export carriers, e.g. multidrug-resistance associated proteins 3 and 4 (Mrp3 and Mrp4), which pump their substrates back into the systemic circulation and make them available for renal excretion. Alternately, substances are excreted via the canalicular plasma membrane into bile. This canalicular excretion is mediated by different ATP-binding cassette (ABC) proteins, e.g. the bile salt export pump (Bsep), multidrug-resistance associated protein 2 (Mrp2) and multidrug resistance P-glycoproteins 1 and 2 (Mdr1 and Mdr2). Most rat hepatocellular transport systems are orthologous to corresponding human transporters.

The expression pattern of transport proteins in normal liver and liver disease has been thoroughly investigated in other studies. However, it is still unclear how chronic renal failure influences transport proteins in the liver.

Therefore, the aims of this thesis were: 1) Investigate the expression of organic anion transporters in livers of rats with chronic renal failure, 2) investigate a potential inhibitory effect of uremic serum and uremic toxins on hepatocellular bile acid and organic anion uptake systems, and 3) investigate liver-specific transcription factors and their possible contribution to altered expression of selected transport proteins in chronic renal failure.

Our first hypothesis was that chronic renal failure alters the expression of hepatocellular transport proteins. Since serum bile acids are increased and hepatic

elimination of organic anions and drugs are decreased in uremia, we expected a down-regulated expression of some uptake carriers and/or an increased expression of rat hepatocellular basolateral export carriers. Western blot analysis of total plasma membrane fractions isolated from rat livers revealed a down-regulation of the hepatocellular uptake carriers, Oatp1a1 and Oatp1b2 and a massive up-regulation of the basolateral efflux system, Mrp3. These results confirm the hypothesis and indicate that altered expression of basolateral transport systems might explain the observed reduction of hepatic excretion capacity for bile acids, organic anions and hepatically cleared drugs in chronic renal failure.

In a second step, we investigated the additional possibility of inhibited hepatocellular uptake systems for bile acids and organic anions by uremic toxins, present in serum of rats with chronic renal failure. We performed transport experiments in *Xenopus laevis* oocytes and stably transfected CHO cells in the presence of uremic serum and of the known uremic toxins indoxyl sulfate (IS) and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF). We could demonstrate that the transport capacity of Ntcp and Oatp1b2 was inhibited by both uremic serum and the uremic toxins. These results complement the expression studies and show that a reduced elimination capacity of the liver in chronic renal failure could be due to both, altered expression of transport proteins and an inhibition of their transport function by specific uremic toxins.

Finally, we investigated the molecular mechanisms, which lead to the massive up-regulation of hepatocellular Mrp3 in chronic renal failure. In preliminary experiments, the hepatocyte-specific nuclear factor 4 α (HNF-4 α) was increased in rats with chronic renal failure. This suggests a possible contribution of this nuclear receptor in the induction of Mrp3. However, the exact mechanism has to be elucidated in further studies.

In summary, this work demonstrates that 1) the expression pattern of organic anion transporters is altered in a rat model of chronic renal failure, whereby the uptake carriers Oatp1a1 and Oatp1b2 are down-regulated and the export system Mrp3 is up-regulated, 2) Ntcp and Oatp1b2 are inhibited in their transport function by uremic toxins, which are present in serum from rats with chronic renal failure, and 3) HNF-4 α is may be responsible for the massive up-regulation of hepatic Mrp3 in uremia.

This study supports the hypothesis that an altered expression and/or function of hepatocellular transport proteins contributes to the reduced hepatic elimination of bile acids, organic anions and drugs in chronic renal failure. If these results can be confirmed in humans, this might result in specific dose adjustments for the affected drugs to prevent additional deterioration of patients with chronic renal failure.

Zusammenfassung

Immer mehr Beobachtungen zeigen, dass die chronische Niereninsuffizienz nicht nur die renale Elimination, sondern auch die hepatische Exkretion von Arzneimitteln beeinträchtigt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die chronische Niereninsuffizienz die Expression und/oder die Funktion der in der hepatischen Elimination von Gallensäuren, organischen Anionen und Arzneimitteln involvierten Transportsysteme beeinflusst.

In der Rattenleber werden endogene und exogene organische Anionen durch den Na^+ -abhängigen Gallensalztransporter (Ntcp) und die Na^+ -unabhängigen organischen Anionentransporter (Oatps) in die Hepatozyten aufgenommen. Diese Transportsysteme sind an der basolateralen Plasmamembran der Hepatozyten lokalisiert. Nach der Aufnahme werden die Substanzen entweder metabolisiert oder unverändert wieder ausgeschieden. Ihre Ausscheidung aus den Hepatozyten erfolgt einerseits via Exportsysteme in der basolateralen Membran, wie zum Beispiel den „Multidrug-resistance“ assoziierten Proteinen 3 und 4 (Mrp3 und Mrp4), welche die Stoffe zurück in den Blutkreislauf pumpen und sie damit für die renale Ausscheidung verfügbar machen. Andererseits werden die Stoffe via die kanalikuläre Plasmamembran der Hepatozyten in die Galle sezerniert. An dieser kanalikulären Sekretion sind eine Reihe von ATP-bindenden Cassetten (ABC) Proteinen beteiligt wie die Gallensäuren-Exportpumpe Bsep, das „Multidrug-resistance“ assoziierte Protein 2 (Mrp2) und die „Multidrug resistance“ P-Glykoproteine 1 und 2 (Mdr1 und Mdr2). Für die meisten dieser Transporter gibt es entsprechende Orthologe im Menschen.

Das Expressionsmuster der hepatischen Transportproteine in der gesunden und kranken Leber wurde an anderer Stelle hinlänglich untersucht. Es ist jedoch nach wie vor unklar, was mit den hepatischen Transportproteinen während chronischer Niereninsuffizienz geschieht.

Die Hauptziele dieser Arbeit waren daher: 1) die Untersuchung der Expression von organischen Anionentransportern in der Leber von Ratten mit chronischer Niereninsuffizienz, 2) die Untersuchung eines möglichen Hemmpotenzials von urämischem Serum und urämischen Toxinen auf die hepatozellulären

Aufnahmesysteme für Gallensäuren und organische Anionen, und 3) Untersuchungen der in der Leber exprimierten Transkriptionsfaktoren und ihrer möglichen Beteiligung an der Kontrolle von Veränderungen des Expressionslevels einzelner Transportproteine bei chronischer Niereninsuffizienz.

Unsere erste Hypothese war, dass bei chronischer Niereninsuffizienz die Expression der hepatischen Transportproteine verändert ist. Aufgrund der Tatsache, dass im urämischen Zustand erhöhte Gallensäuren im Serum und eine reduzierte Elimination von lebergängigen organischen Anionen und Arzneistoffen beobachtet wurde, erwarteten wir eine verminderte Expression gewisser Aufnahmeproteine und/oder eine erhöhte Expression von basolateralen Exportproteinen in Rattenhepatozyten. Western blot Analyse einer aus Rattenlebern isolierten totalen Plasmamembranfraktion ergaben: Erstens, eine verminderte Expression der hepatozellulären Aufnahmesysteme Oatp1a1 und Oatp1b2 und eine massive Aufregulierung des basolateralen Effluxsystems Mrp3. Diese Resultate bestätigen die Hypothese und zeigen, dass eine veränderte Expression von basolateralen Transportsystemen die beobachtete Reduktion der hepatischen Ausscheidungskapazität für Gallensäuren, organische Anionen und lebergängige Arzneimittel bei chronischer Niereninsuffizienz erklären kann.

In einem zweiten Schritt untersuchten wir die zusätzliche Möglichkeit, dass gewisse hepatozelluläre Aufnahmesysteme für Gallensäuren und organische Anionen durch urämische Toxine im Serum gehemmt werden. Dazu wurden Transportexperimente in *Xenopus laevis* Oozyten und stabil transfizierten CHO Zellen in der Gegenwart von urämischem Serum und den bekannten urämischen Toxinen Indoxylsulfat (IS) und 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-Furanpropansäure (CMPF) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Transportfunktionen von Ntcp und Oatp1b2 sowohl durch das urämische Serum als auch durch IS und CMPF gehemmt werden. Diese Resultate ergänzen die Expressionsstudien und sie zeigen, dass die reduzierte Eliminationskapazität der Leber bei chronischer Niereninsuffizienz sowohl durch eine veränderte Expression von Transportproteinen als auch durch die Hemmung ihrer Transportfunktionen durch spezifische urämische Toxine zustande kommt.

Schliesslich untersuchten wir die molekularen Mechanismen der massiven Aufregulation des hepatozellulären Mrp3 bei chronischer Niereninsuffizienz. In preliminären Experimenten war der hepatozyten-spezifische nukleäre Faktor 4 α

(HNF-4 α) in Ratten mit chronischer Niereninsuffizienz heraufreguliert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieser nukleäre Rezeptor an der Induktion von Mrp3 beteiligt ist und allenfalls weitere nukleäre Rezeptoren beeinflusst. Der genaue Mechanismus muss jedoch in weiteren Studien untersucht werden.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass 1) das Expressionsmuster der organischen Anionentransporter in einem Rattenmodell für chronische Niereninsuffizienz verändert ist, wobei spezifisch die Aufnahmesysteme Oatp1a1 und Oatp1b2 herunter- und der Exportcarrier Mrp3 massiv heraufreguliert sind, 2) Ntcp und Oatp1b2 durch urämische Toxine im Rattenserum in ihren Transportfunktionen gehemmt werden, und 3) HNF-4 α möglicherweise für die massive Aufregulierung von hepatischem Mrp3 bei chronischer Niereninsuffizienz verantwortlich ist.

Diese Arbeit unterstützt die Hypothese, dass eine veränderte Expression und/oder Funktion der hepatozellulären Transportproteine an der reduzierten hepatischen Elimination von Gallensäuren, organischen Anionen und Arzneimitteln bei chronischer Niereninsuffizienz beteiligt sind. Wenn diese Resultate beim Menschen bestätigt werden können, so müssen in Zukunft gezielte Dosisanpassungen für entsprechende Medikamente vorgenommen werden um zusätzliche Schädigungen des Körpers bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu verhindern.