



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Role of TNF- $\alpha$ and the NF- $\kappa$ B pathway in drug-induced organ injuries**

Benedetti, G.O.E.

### **Citation**

Benedetti, G. O. E. (2013, May 7). *Role of TNF- $\alpha$  and the NF- $\kappa$ B pathway in drug-induced organ injuries*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20857>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/20857>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20857> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Benedetti, Giulia

**Title:** Role of TNF- $\alpha$  and the NF- $\kappa$ B pathway in drug-induced organ injuries

**Issue Date:** 2013-05-07



# Appendix

Nederlandse samenvatting  
English summary  
Résumé français  
List of abbreviations  
Curriculum vitae  
List of publications



## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Geneesmiddelgeïnduceerde orgaan toxiciteit is een grote zorg voor zowel de farmaceutische industrie alsmede voor de volksgezondheid. Het kan uiteindelijk leiden tot het verwijderen van geneesmiddelen van de markt, danwel, afhankelijk van het geneesmiddel tot verhoging of verlenging van de ziekenhuisopnames. De organen die een belangrijk primair doelwit zijn voor toxiciteit zijn de lever en de nieren. Een reden hiervoor is het feit dat beide organen voortdurend worden blootgesteld aan hoge geneesmiddelconcentraties en daarnaast ook beiden hoge metabolische capaciteit bezitten. Het immuunsysteem speelt een belangrijke rol bij deze orgaan toxiciteit, waarbij in het bijzonder de cytokine tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) verantwoordelijk is voor de verslechtering van de geneesmiddel geïnduceerde lever en nier toxiciteit. In dit proefschrift werd de rol van TNF- $\alpha$  in geneesmiddelgeïnduceerde orgaanschade onderzocht. De centrale vraag was of TNF- $\alpha$  de celdood geïnduceerd door geneesmiddelen verhoogd, en zo ja, wat hierbij het onderliggende mechanisme is.

In de afgelopen jaren zijn middels toxicogenomics onderzoek reeds verschillende cellulaire stress responsen opgehelderd die geactiveerd worden tijdens geneesmiddelgeïnduceerde lever- en nierschade. Allereerst staat in **Hoofdstuk 2** staat een overzicht van deze studies, waarbij studies naar de mechanismen van immuungemedieerde nier- en leverschade worden benadrukt.

In **Hoofdstuk 3**, hebben we getest of blootstelling aan TNF- $\alpha$  zorgt voor verergering van geneesmiddel geïnduceerde celdood door gelijktijdige blootstelling van proximale tubulaire niercellen aan verschillende nefrotoxische geneesmiddelen en de cytokine TNF- $\alpha$ . Met een *in vitro* op zogenaamde high content imaging fluorescentie assay, hebben we aangetoond dat TNF- $\alpha$  in combinatie met de nephrotoxische stoffen tacrolimus, cyclosporine A, azidothymidine en cisplatina de celdood respons verhoogt. Van deze toxische stoffen is bekend dat zij *in vivo* bijdragen aan inflammatie, waarbij voor cisplatina, cyclosporine A en tacrolimus is aangetoond dat dit leidt tot verergering van nefrotoxiciteit, wat de functionaliteit van onze assay bevestigt.

In **Hoofdstuk 4**, zijn de mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de synergistische celdood geïnduceerd door cisplatina en TNF- $\alpha$  verder onderzocht. Met behulp van genexpressie arrays hebben we aangetoond dat de genexpressie van meerdere nierschade markers en van specifieke ontstekingsmediatoren wordt verhoogd door cisplatin/TNF- $\alpha$  behandeling. Dit is in lijn met eerder beschreven *in vivo* bevindingen. Bovendien remde de gecombineerde behandeling cisplatin/TNF- $\alpha$  de activiteit van de pro-survival transcriptiefactor NF- $\kappa$ B en van de pro-apoptotische JNK/c-jun signaleringsroute. De verstoring van het strikt gereguleerde NF- $\kappa$ B/JNK/c-jun evenwicht resulteerde in verhoogde celdood en inflammatoire respons van de proximale tubulus niercellen.

In **Hoofdstuk 5** laten we zien dat TNF- $\alpha$  de cisplatina geïnduceerde celdood niet alleen verhoogd door verandering in intracellulaire stress responsen, maar ook door het veranderen van structurele componenten van de cellen. TNF- $\alpha$  verergert de cisplatina geïnduceerde verstoring van het cytoskelet, verandering van de cel-matrix interactie en de cel-cel verbindingen van proximale tubulaire niercellen. Een van de NF- $\kappa$ B leden, het eiwit RelB, blijkt hierbij essentieel te zijn. De expressie van RelB verhoogde na blootstelling aan cisplatina/TNF- $\alpha$  en verlaging van RelB expressie verlaagde de verhoogde celdood geïnduceerd door TNF- $\alpha$  en de verstoringen van het cytoskelet, cel-matrix-en cel-cel interacties. RelB deed dit via het reguleren van een mesenchymaal fenotype en activering van de GTPase RhoA/Rho kinase signaaltransductie route.

De rol van TNF- $\alpha$  in geneesmiddelgeïnduceerde leverbeschadiging werd onderzocht in **Hoofdstuk 6**. Het geneesmiddel diclofenac werd als model stof gebruikt al dan niet in combinatie met TNF- $\alpha$ . We toonden aan dat de celdood geïnduceerd door diclofenac ook in levercellen werd versterkt door TNF- $\alpha$ . Om een beter begrip te krijgen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de TNF- $\alpha$ -gemedieerde verergering van diclofenacgeïnduceerde celdood, hebben we



individuele kinases, (de)ubiquitinases en immuun componenten uitgeschakeld met behulp van small interferig RNA technieken. We hebben 12 genen geïdentificeerd die betrokken zijn bij lever celdood geïnduceerd door ofwel diclofenac, TNF- $\alpha$  of een combinatie van diclofenac en TNF- $\alpha$ . De meeste van deze genen bleken de NF- $\kappa$ B en JNK route te reguleren, welke we in **hoofdstuk 3** als belangrijke routes hebben geïdentificeerd in de cisplatina/TNF- $\alpha$  gemedieerde celdood. Daarnaast reguleren een aantal genen de p53 route, welke belangrijk is voor geneesmiddelgeïnduceerde celdood. Mogelijk kunnen sommige van deze genen gebruikt worden als nieuwe biomarkers voor toxiciteit, omdat hun genexpressie differentieel gereguleerd wordt door geneesmiddel/cytokine behandeling.

We hebben in **hoofdstuk 3** en **6** laten zien dat de transcriptiefactor NF- $\kappa$ B betrokken is bij de synergetische celdood geïnduceerd door TNF- $\alpha$  in zowel nier en lever cellen. Om de juiste respons te geven in de cellen, moet deze transcriptiefactor in en uit de kern bewegen. In **Hoofdstuk 7** hebben we laten zien dat diclofenac de oscillerende kern translocatie van NF- $\kappa$ B remt en daardoor voorkomt dat pro-survival genen tot expressie komen. We hebben onderzocht wat de rol is van individuele kinases, (de)ubiquitinases en immuun componenten in deze oscillerende kern translocatie door gebruik te maken van siRNA-gemedieerde uitschakeling van genen. Verschillende nieuwe genen zijn geïdentificeerd, welke betrokken zijn bij de controle van de dynamische NF- $\kappa$ B kern translocatie. Bovendien hebben we aangetoond dat sommige van deze genen een direct effect hebben op de celdood geïnduceerd door diclofenac/TNF- $\alpha$ .

Kortom, het werk dat in dit proefschrift beschreven staat, toont aan dat TNF- $\alpha$  de door geneesmiddel veroorzaakte lever en nierschade *in vitro* verergert en biedt een gedetailleerd inzicht in de moleculaire mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de synergetische celdood die optreedt na geneesmiddel/TNF- $\alpha$  behandeling. De kennis die hier opgedaan is kan niet alleen worden gebruikt om nieuwe en betere *in vitro* toxiciteit testen te ontwerpen en verschillende nieuwe potentiële biomarkers te genereren, maar het biedt ook mechanistische inzichten die kunnen worden gebruikt in andere onderzoeksgebieden zoals kanker en immunologie.

## ENGLISH SUMMARY

Drug-induced organ toxicity is a major concern for pharmaceutical industry, due to removal of a high number of drugs from the market, as well as for public health, due to numerous hospitalizations and patient death. The organs that are the primary target for such toxicities are the liver and the kidneys since both organs are continuously exposed to high concentrations of drugs and have high metabolic capacities. The immune system has been shown to be involved in the toxicity of several drugs- inducing liver and kidney injury. In particular, the cytokine tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) has been shown to be the main constituent of the inflammatory processes responsible for the aggravation of drug-induced liver and kidney injuries. In this thesis, the role of TNF- $\alpha$  in drug-induced organ injury was investigated. The main question was to assess the possible synergy between TNF- $\alpha$  and drug-induced cytotoxicities, and to unravel the underlying molecular mechanisms of such a synergy

Various cellular stress response pathways involved in drug-induced liver and kidney injury were already previous revealed using toxicogenomics methods. An overview of these studies is provided in **Chapter 2** in which we emphasized studies investigating mechanisms of immune mediated kidney and liver injuries.

In **Chapter 3**, we tested the hypothesis of a synergistic response between drug and cytokine by co-exposing proximal tubular kidney cells to a combination of the cytokine TNF- $\alpha$  and drugs known to cause nephrotoxicity. Using an *in vitro* fluorescence-based high content imaging assay, we demonstrated that TNF- $\alpha$  enhanced the cell death response when combined with four nephrotoxicants: tacrolimus, cyclosporine A, azidothymidine and cisplatin. These toxicants are known to induce inflammation *in vivo*, which has been linked to an enhancement of nephrotoxicity for cisplatin, cyclosporine A and tacrolimus, confirming the functionality of our assay.

In **Chapter 4**, the mechanisms responsible for the synergistic cell death observed with cisplatin and TNF- $\alpha$  were further investigated. Using a gene expression approach, we showed that the gene expression levels of several kidney injury markers combined with activation of specific inflammatory mediators were enhanced by cisplatin/TNF- $\alpha$  treatment, resembling the *in vivo* situation. In addition, the combined cisplatin/TNF- $\alpha$  treatment inhibited the activity of the pro-survival transcription factor NF- $\kappa$ B and resulted in activation of the pro-apoptotic JNK/c-jun pathway. Alteration of the tightly regulated NF- $\kappa$ B/JNK/c-jun balance resulted in enhanced cell death and inflammatory response of the renal proximal tubular epithelial cells.

In **Chapter 5**, we showed that TNF- $\alpha$ -mediated aggravation of cisplatin-induced cell death did not only involve alterations in intracellular stress pathways but also alterations in structural components of the cells. TNF- $\alpha$  increased cisplatin-induced disruption of the cytoskeleton, the attachment to the matrix and the cell-cell junction of proximal tubular kidney cells. One of the NF- $\kappa$ B members, the protein RelB, was shown to be essential. Its expression was up-regulated upon exposure to TNF- $\alpha$  and cisplatin/TNF- $\alpha$ , while prevention of its expression abrogated the enhanced cell death induced by TNF- $\alpha$  and reduced the disruption to the cytoskeleton, cell-matrix and cell-cell interactions. RelB did so via controlling the mesenchymal-like phenotype through activation of the GTPase RhoA/Rho kinase pathway.

The role of TNF- $\alpha$  in drug-induced liver injury was investigated in **Chapter 6**. The model compound diclofenac was used alone or in combination with TNF- $\alpha$ . We showed that the cell death induced by diclofenac was enhanced by TNF- $\alpha$  in liver cells. To better understand the detailed mechanism of TNF- $\alpha$ -mediated aggravation of diclofenac-induced cell death, we silenced individual kinases, (de)ubiquitinases and immune components before exposing the cells using a siRNA knock-down approach. We identified 12 genes involved in liver cell death induced by either diclofenac, TNF- $\alpha$  or a combination of diclofenac and TNF- $\alpha$ . Most of these genes were known to regulate the NF- $\kappa$ B and JNK



pathway, which we previously identified as main contributors to TNF- $\alpha$ /cisplatin-induced cell death (**chapter 3**). In addition, the genes were described to regulate the p53 pathway, known to regulate cell death. Potentially, some of these genes could be used as novel toxicity biomarkers since their gene expression was differentially regulated by drug/cytokine treatment.

We showed in **chapters 3** and **6** that the transcription factor NF- $\kappa$ B is involved in the synergistic cell death induced by TNF- $\alpha$  in both kidney and liver cells. Upon TNFR activation, NF- $\kappa$ B shows an oscillatory nuclear translocation pattern, which is essential in the downstream activation of target genes and hence proper cellular responses to cytokine exposure. In **Chapter 7**, we showed that the drug diclofenac inhibited this oscillatory response, thereby preventing the induction of pro-survival genes. We investigated the role of individual kinases, (de)ubiquitinases and immune components in the control of this oscillatory response by silencing their expression using siRNA-mediated knock-downs. We identified various genes involved in the control of NF- $\kappa$ B nuclear translocation dynamics and showed that these have a direct impact on the cell death response induced by the combined diclofenac/TNF- $\alpha$  treatment.

In summary, the work presented in this thesis demonstrates that TNF- $\alpha$  aggravates drug-induced liver and kidney injury *in vitro* and provides a detailed understanding of the molecular mechanisms activated and responsible for this synergistic cell death. The knowledge gathered here can not only be used to design novel and better *in vitro* toxicity tests and to generate several novel potential biomarkers, but it also provides useful mechanistic insights that could be used in other fields of research such as cancer biology or immunology.



## RESUME FRANCAIS

La toxicité des médicaments est une préoccupation majeure pour l'industrie pharmaceutique; de plus en plus d'entre eux sont retirés du marché à cause d'effets secondaires indésirables non détectés avant la mise en vente, certains inconvénients majeurs entraînant même des hospitalisations voire des décès. Les organes les plus touchés par ces effets toxiques sont le foie et les reins, ceux-ci étant continuellement exposés et particulièrement sensibles à une concentration élevée de drogues et/ou de substances toxiques, ils ont en plus des capacités métaboliques élevées. Le système immunitaire s'est aussi révélé être impliqué dans la toxicité hépatique et rénale de plusieurs médicaments. En particulier, la cytokine tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a été identifiée comme le principal constituant des processus inflammatoires responsables de l'aggravation de la toxicité médicamenteuse du foie et des reins. L'objet de cette thèse a été d'évaluer la synergie possible entre TNF- $\alpha$  et les toxicités d'origine médicamenteuse et d'élucider les mécanismes moléculaires sous-jacents d'une telle synergie.

Plusieurs mécanismes de toxicité du foie et des reins ont déjà été précédemment révélés en utilisant des méthodes de toxicogénomique. Un aperçu de ces études figure dans le **Chapitre 2** et la relation entre les mécanismes de toxicité des reins, du foie régulé par le système immunitaire y ont été soulignés.

Dans le **Chapitre 3**, nous avons vérifié l'hypothèse de synergie entre médicaments et cytokines en co-exposant des cellules rénales tubulaires proximales à plusieurs médicaments connus pour causer une néphrotoxicité et à la cytokine TNF- $\alpha$ . En utilisant un système de fluorescence *in vitro* high content imaging, nous avons démontré que TNF- $\alpha$  augmentait la mort cellulaire lorsqu'il était combiné avec quatre néphrotoxiques, à savoir tacrolimus, cyclosporine A, azidothymidine, et cisplatine. Ces substances toxiques sont connues pour induire effectivement une inflammation *in vivo* elle-même liée à une augmentation de la néphrotoxicité pour cisplatine, cyclosporine A et tacrolimus, ceci confirmant la validité de notre système *in vitro*.

Dans le **Chapitre 4**, les mécanismes responsables de la mort cellulaire synergique observée avec la cisplatine et TNF- $\alpha$  ont été étudiés en particulier. En utilisant une approche d'expression des gènes, nous avons montré que certains gènes connus comme étant marqueurs d'atteinte rénale associés à l'activation de médiateurs inflammatoires spécifiques sont plus exprimés lors du traitement combiné cisplatine/TNF- $\alpha$ , à l'identique de la situation *in vivo*. En outre, le traitement combiné cisplatine/TNF- $\alpha$  a inhibé le facteur de transcription NF- $\kappa$ B régulant la survie cellulaire et a activé la voie pro-apoptotique de JNK/c-jun. La modification de l'équilibre NF- $\kappa$ B/JNK/c-jun étroitement régulé a entraîné une mort cellulaire et une réponse inflammatoire accrues des cellules.

Dans le **Chapitre 5**, nous avons montré que TNF- $\alpha$  augmente la mort cellulaire induite par cisplatine en modifiant non seulement les voies de stress intracellulaires, mais aussi les composants structuraux des cellules. TNF- $\alpha$  a accru la perturbation du cytosquelette, l'attachement à la matrice et la jonction cellule-cellule des cellules rénales tubulaires proximales induite par la cisplatine. Un des membres de NF- $\kappa$ B, la protéine RelB, s'est révélé un facteur essentiel. Prévenir son expression supprima la mort cellulaire accrue induite par TNF- $\alpha$  et réduisit la perturbation du cytosquelette et des interactions cellule-matrice et cellule-cellule. Cette protéine agit en transformant les cellules en un phénotype plus mésenchymateux par activation de la GTPase RhoA.

Le rôle de TNF- $\alpha$  dans les lésions hépatiques d'origine médicamenteuse a également été étudié dans le **Chapitre 6**. Le médicament modèle diclofenac a été utilisé en combinaison ou non avec TNF- $\alpha$ . Nous avons montré que la mort cellulaire induite par diclofenac était également augmentée par TNF- $\alpha$  pour les cellules hépatiques. Afin de mieux comprendre le mécanisme de TNF- $\alpha$  induisant l'aggravation de la mort cellulaire provoquée par diclofenac, nous avons neutralisé individuellement les kinases, (de)ubiquitinasés et composants immunitaires avant d'exposer les cellules. Nous avons identifié 12



gènes impliqués dans la mort des cellules du foie induite par diclofenac ou TNF- $\alpha$  ou une combinaison de diclofenac et TNF- $\alpha$ . La plupart de ces gènes sont connus pour réguler principalement NF- $\kappa$ B et JNK identifiés dans le **chapitre 3**, ainsi que p53 connu pour réguler la mort cellulaire. Potentiellement, certains de ces gènes pourraient être utilisés comme nouveaux biomarqueurs de toxicité puisque leur expression est différenciellement régulée par le traitement drogue/cytokine.

Nous avons démontré dans les **chapitres 3 et 6** que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B était impliqué dans la mort cellulaire synergique induite par TNF- $\alpha$  pour les cellules du rein et du foie. Après activation du récepteur TNFR, NF- $\kappa$ B suit un schéma de translocation nucléaire oscillatoire qui est essentiel dans l'activation des gènes cibles et donc à une réponse correcte des cellules. Dans le **Chapitre 7**, nous avons montré que le médicament diclofenac inhibe cette réponse oscillatoire prévenant ainsi l'induction des gènes de survie. Nous avons étudié le rôle individuel des kinases, (de)ubiquitinasés et composants immunitaires dans le contrôle de cette réponse oscillatoire en neutralisant leur expression. Nous avons identifié plusieurs nouvelles protéines impliquées dans le contrôle de la dynamique de translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et avons montré que cela avait un impact direct sur la mort cellulaire résultant du traitement combiné diclofenac/TNF- $\alpha$ .

En résumé, le travail présenté dans cette thèse montre que TNF- $\alpha$  aggrave les lésions médicamenteuses rénales et hépatiques *in vitro* et permet une compréhension détaillée des mécanismes moléculaires activés et responsables de cette mort cellulaire synergique. Les connaissances rassemblées ici peuvent être utilisées non seulement pour concevoir de nouveaux et meilleurs tests de toxicité *in vitro* et de générer de nouveaux biomarqueurs potentiels, mais il fournit également des connaissances mécanistiques utiles qui pourraient être utilisées dans d'autres domaines de recherche, comme le cancer ou l'immunologie.

## LIST OF ABBREVIATIONS

$\alpha$ -SMA	Alpha smooth muscle actin
ACE	Angiotensin-converting enzyme
ADR	Adverse drug reactions
AIF	Apoptosis-inducing factor
AKI	Acute kidney injury
ALP	Alkaline phosphatase activity
ALT	Alanine aminotransferase
AnxV	Annexin V
AP1	Activator protein 1
APAP	Acetaminophen
APAP-NAC	N-acetyl-L-cysteine acetaminophen
ARF	Acute renal failure
AST	Aspartate aminotransferase activity
AUC	Area under the curve
BAC	Bacterial artificial chromosome
BDKRB2	Bradykinin receptor B2
BFK	Bcl2-like kin
BIP	Binding immunoglobulin protein
BNP	Brain natriuretic peptide
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CCl4	Carbon tetrachloride
CBZ	Carbamazepine
CDF curves	Cumulative distance function curves
CHOP	C/EBP-homologous protein
Cisplatin	Cis-diammineplatinum(II) dichloride
c-myc	Myelocytomatosis oncogene
COMET	Consortium for Metabolomic Toxicology
COX-2	Cyclooxygenase-2
CREB	cAMP response element binding protein
CsA	Cyclosporine A
Ct	Cycle threshold
CTSL	Cathepsin L
CYLD	Cylidromatosis
DCF	Diclofenac
DCVC	S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine
DHMEQ	Dehydroxymethylepoxyquinomicin
DILI	Drug-induced liver injury
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECM	Extracellular matrix
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-to-mesenchymal transition
Epac	Exchange protein directly activated by cAMP
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	Endoplasmic reticulum-associated degradation



ERK	Extracellular signal regulated kinase
ESR1	Estrogen receptor
FA	Focal adhesion
F-actin	Filamentous actin
FAK	Focal adhesion kinase
FADD	Fas-associated death domain
FBS	Fetal bovine serum
FDR	False discovery rate
FK506	Tacrolimus
GCSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GFP	Green fluorescent protein
GFR	Glomerular filtration rate
GGT	Gamma-glutamyltransferase activity
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GST $\alpha$	Glutathione S-transferase class $\alpha$
HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HEK293	Human embryonic kidney 293 cells
HepG2	Human hepato-carcinoma G2 cell line
HGF	Hepatocyte growth factor
HNF4- $\alpha$	Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$
HO-1	Hemeoxygenase 1
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICU	Intensive care unit
IFN- $\gamma$	Mouse interferon- $\gamma$
I $\kappa$ B	Inhibitor of $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IM-PTEC	Immortalized proximal tubular epithelial cell
IP 9/10	Interferon-gamma-inducible protein 9/10
IPA <sup>®</sup>	Ingenuity Pathway Analysis
I/R	Ischemia/reperfusion
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KIM-1	Kidney injury molecule-1
L-FABP	Liver-type fatty acid-binding protein
LCN2	Lipocalin 2
LEF-1	Lymphoid enhancer factor 1
LLC-PK1	Lilly laboratories cell porcine kidney cell line
LMP1	Latent membrane protein 1
LPS	Lipopolysaccharide
LRP2	Megalyn
MAPK	Mitogen activated protein kinases
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MDCK	Madin darby canine kidney
MIP2	Macrophage inflammatory protein 2
MLCK	Myosin light chain kinase
MR	Mineralocorticoid receptor

mRNA	messenger RNA
MTX	Methotrexate
NAG	N-Acetyl- $\beta$ -glucosaminidase
NGAL	Neutrophil gelatinase associated lipocalin
NEMO	NF- $\kappa$ B essential modifier
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
NHE-3	Sodium/hydrogen exchanger isoform 3
NIK	NF- $\kappa$ B inducing kinase
NLS	Nuclear localization signal
NRF2	Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
OAT1	Organic anion-transporting polypeptide 1
OTA	Ochratoxin A
PAN	Puromycinaminonucleoside
PCA	Principal component analysis
PERK	Protein kinase R-like ER kinase
PPAR- $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$
PTEC	Proximal tubular epithelial cell
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
RANKL	Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted protein
RBP	Retinol-binding protein
RIP1	Receptor-interacting protein 1
RNAi	RNA interference
ROCK	Ser/Thr kinase Rho-kinase
ROS	Reactive oxygen species
RPTE	Renal proximal tubular epithelial
S100A4	S100 calcium binding protein A4
SAMe	Adenosylmethionine
S.E.M.	Standard error of the mean
shCtrl	Control shRNA
shRelB	shRNA RelB
shRNA	Short hairpin RNA
siCtrl	Non-targeting siRNA
siCasp8	siRNA targeting caspase 8
SILAC	Stable isotope labelling with amino acids
siRNA	Small interfering RNA
SPP1	Osteopontin
TBL	Total bilirubin
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TLR	Toll-like receptor
TMAO	Trimethylamine-N-oxide
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TNAFAIP3/A20	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3
TNFR	TNF receptor
TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase
TRADD	TNFR1-associated death domain protein



TRAF	TNF receptor associated factor
TSP-1	Thrombospondin 1
UA	Usnic acid
uPAR	Urokinase receptor
UPR	Unfolded protein response
VDR	Vitamin D receptor
Wt	Wild type
Xaf1	X-linked inhibitor of apoptosis protein associated factor 1
ZO-1	Zona occludens 1

## CURRICULUM VITAE

Giulia Benedetti was born on the 13th of January 1982 in Versailles, France. In 2003 she completed a bachelor in biochemistry with a major in integrative cellular physiology. She then obtained a master in biochemistry with a major in cellular and molecular biology which was performed in Leeds, England within the exchange programme of ERASMUS. During this period, she completed a 3 months research project entitled “amplified expression and purification of three membrane transport proteins from *Helicobacter pylori*” under supervision of prof dr. Peter Henderson. Thereafter she studied biotechnology at the engineering school ESIL in Marseille, France during which she performed a 6-months internship in the biotech company of Pioneer Hi-Bred international in Redwood City, USA, working on the screening of a small peptide library in order to discover new anti-nematodal agents under supervision of dr. Jun-zhi Wei . She obtained her Engineer degree in 2007. In addition, she performed a 6-months professional trainee in a laboratory in Montreal, Canada where she studied the signal transduction of Pkd1 in an autosomal dominant polycystic kidney disease mouse model under supervision of prof. dr. Marie Trudel. In February 2008 she started her PhD project at the Division of Toxicology, headed by prof. dr. Bob van de Water at Leiden University, Leiden, The Netherlands under the supervision of Dr. Marjo de Graauw. This project was funded by the Dutch Genomics Initiative (NGI) and aimed at investigating the role of inflammation in drug-induced organ injury as described in this thesis. She obtained an award for best poster at the LACDR spring symposium 2011.



## LIST OF PUBLICATIONS

### PEER-REVIEWED JOURNALS

**Benedetti G**, Fredriksson L, Herpers B, Meerman J, van de Water B, de Graauw M. 2013. **TNF- $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B Survival Signalling Impairment by Cisplatin Enhances JNK Activation Allowing Synergistic Apoptosis of Renal Proximal Tubular Cells.**

Biochemical Pharmacology 85(2):274-86.

Fredriksson L, Herpers B, **Benedetti G**, Matadin Q, Puigvert JC, de Bont H, Dragovic S, Vermeulen NP, Commandeur JN, Danen E, de Graauw M, van de Water B. 2011. **Diclofenac inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced nuclear factor- $\kappa$ B activation causing synergistic hepatocyte apoptosis.**

Hepatology. 53(6):2027-41.

Saidijam M, **Benedetti G**, Ren Q, Xu Z, Hoyle CJ, Palmer SL, Ward A, Bettaney KE, Szakonyi G, Mueller J, Morrison S, Pos MK, Butaye P, Walravens K, Langton K, Herbert RB, Skurray RA, Paulsen IT, O'reilly J, Rutherford NG, Brown MH, Bill RM, Henderson PJ. 2006. **Microbial drug efflux proteins of the major facilitator superfamily.**

Curr Drug Targets 7(7):793-811.

**Benedetti G**, Fredriksson L, Herpers B, Meerman J, Yan K, van de Water B, de Graauw M. 2012. **The NF- $\kappa$ B family member RelB facilitates apoptosis of renal epithelial cells caused by cisplatin/TNF- $\alpha$  synergy by suppressing an EMT-like phenotypic switch.**

Molecular Pharmacology. Conditionally accepted pending revision.

**Benedetti G**, Ramaiahgari S, Fredriksson L, Herpers B, Price LS, van de Water B, de Graauw M. 2012. **A screen for apoptotic synergism between clinical relevant nephrotoxicants and the cytokine TNF- $\alpha$ .**

Submitted to In Vitro Toxicology.

Fredriksson L, Herpers B, Wink S, **Benedetti G**, Luijten M, de Bont H, Danen E, de Graauw M, Meerman J, van de Water B. 2012. **Translation initiation factor EIF4A1 determines TNF $\alpha$ -mediated apoptosis in drug-induced liver injury through the stress protein CHOP.**

Submitted to Hepatology.



**Benedetti G<sup>1</sup>, Herpers B<sup>1</sup>, Fredriksson L<sup>1</sup>, Di Z, de Bont H, Meerman J, de Graauw M, van de Water B. 2013. Live-cell Imaging-based NF-kappaB Activity RNAi Screen Identifies Novel Regulators of the TNF Receptor Inhibitor A20/TNFAIP3.**

Manuscript in preparation. (<sup>1</sup>contributed equally to the manuscript)

**Benedetti G<sup>1</sup>, Fredriksson L<sup>1</sup>, Herpers B<sup>1</sup>, de Graauw M, van de Water B. 2013. A siRNA screen for diclofenac and TNF- $\alpha$  cytotoxicity synergy response.**

Manuscript in preparation. (<sup>1</sup>contributed equally to the manuscript)

### **BOOK CHAPTERS**

**Benedetti G, van de Water B, de Graauw M. An overview of toxicogenomics approaches in kidney toxicity studies.** Toxicogenomics and alternatives to current animal models for safety assessment. Kleinjans J.

Submitted

