Universiteit
Leiden
The Netherlands

Advanced in vitro models for studying drug induced toxicity

Ramaiahgari, S.C.

Citation

Ramaiahgari, S. C. (2014, June 4). *Advanced in vitro models for studying drug induced toxicity*. Department of Toxicology, Leiden Academic Center for Drug Research (LACDR), Faculty of Science, Leiden University. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/25852

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/1887/25852

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

Cover Page

Universiteit Leiden

The handle http://hdl.handle.net/1887/25852 holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Ramaiahgari, Sreenivasa Chakravarthy
Title: Advanced in vitro models for studying drug induced toxicity
Issue Date: 2014-06-04

APPENDIX

NEDERALANDSE SAMENVATTING
ENGLISH SUMMARY
LIST OF ABBREVIATIONS
CURRICULUM VITAE
LIST OF PUBLICATIONS

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Medicijn-geïnduceerde orgaantoxiciteit is een groot probleem bij de ontwikkeling van medicijnen en voor de veiligheid van patiënten die een behandeling ondergaan. Een medicijn bestempelen als veilig is een ingewikkelde uitdaging en de tijd heeft bewezen dat huidige methodes niet altijd betrouwbaar zijn. Hierdoor heeft de wetenschappelijke gemeenschap een impuls gekregen om het ontwikkelingsproces van medicijnen te verbeteren. Het bepalen van toxiciteit wordt vandaag de dag gedaan door onderzoek op knaag- of andere zoogdieren. Dit soort onderzoek is op dit moment de enige manier om toxiciteit op lange termijn te bepalen – ondanks dat de voorspellende waarde van dierstudies soms wordt betwijfeld.

Toxiciteit is vaak idiosyncratisch, wat betekent dat slechts enkele personen van de groep die het medicijn neemt toxische reacties vertonen. Deze personen reageren anders op de medicijnen vanwege hun specifieke genetische achtergrond of een achterliggende ziekte. Hierdoor is het nog moeilijker om het type toxiciteit van een geneesmiddel te voorspellen voordat het middel op de markt komt. Het is daarom belangrijk om het precieze mechanisme van toxiciteit te onderzoeken en mensen op de hoogte te stellen van de mogelijke bijwerkingen van een geneesmiddel. Dankzij de technologische ontwikkelingen van de afgelopen jaren kunnen we op dit moment zelfs kleine veranderingen in de expressie van duizenden genen tegelijk associëren met medicijngebruik. Desondanks is kennis over het mechanisme van toxiciteit van veel geneesmiddelen slechts minimaal aanwezig of zelfs afwezig. Een van de redenen is het gebrek aan juiste modellen om toxiciteit in mensen te voorspellen. Cellen, geïsoleerd uit humaan weefsel, vormen een beter modelsysteem dan de huidige modellen, maar deze cellen kunnen niet een lange tijd buiten het lichaam overleven. Daarentegen kunnen geimmortaliseerde humane cellijnen zoals HepG2 levercellen onbeperkt groeien en zijn ze dus een geschikte bron van cellen voor in vitro onderzoek. Het nadeel van deze cellen is dat zij hun weefselspecifieke functies niet kunnen vasthouden in standaard celkweek, waardoor de voorspellende waarde voor toxiciteit-onderzoek sterk afneemt. Het behouden van weefselspecifieke functies gedurende celkweek is essentieel voor de betrouwbaarheid van in vitro modellen. Sinds de ontwikkeling van de weefselkweekflessen rond 1920 zijn er geen grote veranderingen meer geweest in de standaard kweekmethoden. Op dit moment zijn driedimensionale kweekmethoden in ontwikkeling, maar zij hebben nog geen plaats in de standaard kweekmethoden gebruikt voor in vitro toxiciteits-testen. Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van een drie dimensioneel (3D) model waarin meercellige weefsels gekweekt worden in een hydrogel, waarbij de weefselspecifieke functies behouden blijven. Aangezien de lever een grote rol speelt in detoxificatie van medicatie en vaak de meeste schade oploopt gedurende medici-

jn-geïnduceerde toxiciteit, hebben we ons het meest gericht op de ontwikkeling van een robuust in vitro model voor levertoxiciteit. Verder beschrijft dit proefschrift ook ons onderzoek naar hoe het immuunsysteem niertoxiciteit kan verergeren en introduceren we een geavanceerde screeningsmethode die gebruikt kan worden om celtoxiciteit te meten.

Lichaamscellen leven in een drie-dimensionele ruimte omgeven door extracellulaire matrix. Deze matrix speelt ook een rol in signaleringsprocessen en regeling van weefselspecifieke functies. De hydrogel Matrigel en de extracellulaire matrix hebben vergelijkbare eigenschappen en deze gel is dus geschikt om levercellen op te laten groeien. Zoals beschreven in **hoofdstuk 2**, stoppen HepG2 levercellen gekweekt op een 3D hydrogel met delen, differentiëren ze en behouden de weefselspecifieke functies van primaire levercellen beter dan dezelfde HepG2 cellen gekweekt op standaard plastic 2D kweekschaaltjes. Zo vertonen in 3D gekweekte HepG2 cellen bijvoorbeeld een hogere expressie en functie van genen betrokken bij het metabolisme van geneesmiddelen. Door dit herstelde metabolisme kan het oorspronkelijke medicijn worden gemetaboliseerd tot een toxische tussenvorm, en herkend worden als een mogelijke toxische stof. De verhoogde gevoeligheid van dit model maakt ook het onderzoek naar het onderliggende mechanisme van toxiciteit mogelijk. In **hoofdstuk 3** wordt een microarray analyse beschreven waarin de genexpressie van in 3D gekweekte HepG2 sferoïden een significante verandering laat zien van moleculaire signaleringsroutes die betrokken zijn bij het metabolisme van geneesmiddelen. Verscheidene andere signaleringsroutes geassocieerd met het behoud van lever-specifieke functies waren ook sterker aanwezig in 3D HepG2 sferoïden dan in de 2D HepG2 celkweken. Analyse van het hele genoom van levercellen, gekweekt in verschillende in vitro modellen, laat grote verschillen en overeenkomsten zien vergeleken met primaire levercellen. Expressie van genen betrokken bij de celcyclus was sterk onderdrukt in 3D gekweekte HepG2 cellen en daardoor vergelijkbaar met cellen uit de menselijke lever. Dit bevestigt onze observaties in **hoofdstuk 2**. Continue proliferatie in 2D celkweken beperkt blootstelling aan stoffen voor langere periodes, omdat de cellen dan alle beschikbare groeiruimte bezetten en uiteindelijk doodgaan door gebrek aan ruimte. Als de cellen georganiseerd worden in een gepolariseerde 3D sferoïde stopt de proliferatie. Het fenotype wordt behouden voor vele dagen, waardoor het model geschikt is om de effecten van geneesmiddelen gedurende langere periodes te onderzoeken. Herhaalde stimulaties maakten cellen gevoeliger voor toxische effecten en verbeterde identificering van toxische stoffen in ons onderzoek (**hoofdstuk 2**). In 3D gekweekte HepG2 sferoïden zijn gemakkelijk in gebruik en ontwikkelen een gedifferentieerd fenotype vergelijkbaar met primaire levercellen. Dit maakt deze kweekmethode een veelbelovend model voor het routinematig screenen van nieuwe geneesmiddelen.

In **hoofdstuk 4** hebben we een systematische vergelijking gemaakt van veranderingen in genexpressie in verscheidene in vitro en in vivo modellen na blootstelling aan diclofenac, een bekend hepatotoxisch middel. Dit heeft geleid tot een beter begrip van de onderliggende stresssignaleringsroutes in humane- en diermodellen. In 3D gekweekte HepG2 sferoïden reageerden sterker op diclofenac en de diclofenac-geïnduceerde stressresponsen waren vergelijkbaar met die in humane levercoupes. Moleculaire mechanismen geassocieerd met diclofenac-geïnduceerde leverschade zoals de Nrf2 signaalcascade en mitochondriële dysfunctie, waren verhoogd. Dit impliceert dat in 3D gekweekte HepG2 sferoïden een goed model vormen voor toekomstig toxicogenomisch onderzoek.

In **hoofdstuk 5** hebben we de rol van TNFα, een pro-inflammatoir cytokine in medicijn-geïnduceerde niertoxiciteit onderzocht. Pro-inflammatoire signaalstoffen spelen een belangrijke rol in het verergeren van de toxiciteit van sommige medicijnen. Voor deze studie gebruikten we een zogeheten 'high-content assay' , waarin over tijd apoptose en necrose als gevolg van een gecombineerde stimulatie van TNFα en niertoxische stoffen werd bepaald. Voor cisplatine, cyclosporine A, tacrolimus en aiodothymidine werd een synergistich effect waargenomen in combinatie met TNFα. Voor de andere niertoxische stoffen konden we geen synergistisch effect waarnemen in dit experiment, alhoewel dit misschien wel het geval is in een verbeterd model zoals in een 3D cell culturen en/of het gebruik van andere reporters gedurende het experiment. Ondanks deze tekortkomingen kan deze 'high-content assay' een nieuwe screening-techniek op industriële schaal vormen, speciaal voor het screenen van chemische stoffen.

Kort samengevat hebben onze studies aangetoond dat met 3D celkweek een fysiologisch relevante niche ontstaat waarin cellen worden gestimuleerd om geïntegreerde weefsels met weefselspecifieke eigenschappen te vormen. Grote voordelen van deze 3D kweken zijn de aanwezigheid van een actief metabolisme van medicijnen en de stabiliteit van de celeigenschappen over een langere tijd. Dit maakt dit type celkweek uitermate geschikt voor het testen van geneesmiddelen op grote schaal. Het incorporeren van fluorescente reporter eiwitten uit stress signaleringsroutes zou dit model bijvoorbeeld kunnen uitbreiden en verbeteren en zal leiden tot nieuwe mogelijkheden in de reguliere testen voor toxiciteit in de toekomst.

ENGLISH SUMMARY

Drug induced organ toxicity has remained a major challenge in drug development and for the safety of patients undergoing treatment. Classifying a drug as safe is a complex challenge and history has shown that the current methods are not always reliable, driving innovation in the scientific community to improve the drug discovery pipeline. Toxicity assessment using rodent and other mammalian species as surrogate models is a common practice as they are the only available alternative for studying long-term effects of the drug – although the reliability of other species in predicting human toxicity is under question.

Toxicity is often idiosyncratic affecting only few individuals due to their genetic background or underlying disease conditions which makes it even more complicated to predict a type of toxicity before a drug is released into the market. Therefore it is important to study the detailed mechanism of toxicity associated with a drug and alert people to potential side effects. Though the technology has advanced in recent years allowing us to study changes in thousands of genes upon drug exposure using microarray or sequencing technologies, current knowledge on the mechanisms associated with drug-induced toxicity is either minimal or absent for the majority of drugs. This is partly due to the absence of test models that would respond in a similar way to humans when exposed to a drug. Freshly isolated cells from human tissues can serve as better test models but they cannot survive for long periods outside the body in a non-physiological environment. With their unlimited growth, immortalized human cells obtained either by genetic manipulation or from a cancer tissue represent a convenient source of cells for *in vitro* studies, but they are unable to maintain tissue specific functions in a culture dish limiting their value in understanding human toxicity. Improvements in current culture methods to preserve organ specific functions are essential for reliable *in vitro* models. Since the development of the tissue culture flask in the early 1920's there haven't been major advances in standard in vitro tissue culture practices. Methods to culture three-dimensional tissues are developing rapidly, but have not yet entered mainstream use for in vitro testing. This thesis describes the development of a hydrogel based three-dimensional (3D) model for culturing multicellular tissues that retain their specialized functions. Since liver plays a major role in drug detoxification and is a prime target for drug induced liver injury, we mainly focused on developing a robust *in vitro* model for assessing liver toxicity as a first step. This thesis also describes our investigation to understand the role of immune mediators in aggravating kidney injury and introduces an advanced high-content screening approach that we used to measure cytotoxicity.

Cells in our body reside in a three-dimensional space surrounded by extracellular matrix, which mediates cellular signaling and regulation of tissue specific

functions. We used Matrigel, a hydrogel that has similar properties to extracellular matrix and supports the growth of hepatocytes. As shown in **chapter 2**, HepG2 cells cultured on a 3D hydrogel stop proliferating, differentiate and maintain specialized functions of hepatocytes to a higher degree than cells cultured as monolayer cultures on a two-dimensional (2D) plastic dish. Gene expression and function of several important drug metabolising enzymes are significantly increased when HepG2 cells are placed in 3D culture. This increased functionality can enable drugs to be metabolized into their toxic intermediates and manifest their toxic effects. The resulting increase in sensitivity to toxic compounds also facilitates investigation of the underlying mechanisms involved in onset of toxicity. In **chapter 3**, microarray gene expression analysis demonstrated significant upregulation of molecular pathways associated with drug metabolism in 3D HepG2 spheroid cultures. Several other molecular pathways that are associated with physiological maintenance of liver-specific functions were also enriched in 3D HepG2 spheroids compared to 2D monolayer cultures. Whole genome gene expression comparison of in vitro cellular models to human liver gene expression showed the similarities and differences associated with cellular models. Cell cycle pathway was strongly suppressed in 3D HepG2 cultures and the gene expression was similar to human liver supporting our observations in **chapter 2**. Continuous cell proliferation in 2D cultures is a major limitation for long-term drug exposures, as cells occupy the available space and die due to overcrowding. Once the cells organize into a polarized spheroid in 3D cultures they stop proliferating and maintain this stable phenotype for several days presenting opportunities to study long-term effects of drugs *in vitro*. Repeated exposures were indeed more sensitive in identifying toxic compounds in our study (**Chapter 2**). With its ease of use, availability and a differentiated phenotype showing many hallmarks of liver tissue 3D HepG2 spheroid cultures are promising for routine drug screening assays. In **chapter 4**, we made a systematic comparison of gene expression changes in various in vitro and in vivo models upon exposure to the hepatotoxicant, diclofenac. This allowed us to understand the cellular stress responses associated with the toxicant and their expression in human and animal model systems. We have seen that 3D HepG2 spheroids were more responsive to diclofenac induced stress responses resembling human precision cut liver slices. Molecular mechanisms that are known to be associated with diclofenac injury such as Nrf2 signaling pathway and mitochondrial dysfunction were enriched indicating that this model may be useful for future toxicogenomic studies.

In **chapter 5**, we investigated the role of the pro-inflammatory cytokine, TNFα, in drug-induced nephrotoxicity. Inflammatory mediators are known to play a major role in aggravating toxicity induced by some drugs. In this study we set up a high-content screening approach to measure apoptosis and necrosis in real time

upon exposure to nephrotoxicants in the presence of TNFα. The assay was sensitive in identifying a synergistic effect of TNFα in enhancing nephrotoxicity caused by cisplatin, cyclosporineA, tacrolimus and aziodothymidine. We were unable to detect toxicity induced by other nephrotoxicants, which may be improved by using three-dimensional cell cultures and/or including other reporters for live cell imaging. Nonetheless, our automated real time imaging represents a novel high-content screening approach to screen for chemical entities on an industrial scale.

In summary, our studies have shown that 3D cultures provide a physiological niche to cells allowing them to form integrated tissues with associated tissue specific functions. The presence of active drug metabolism pathways and their ability to maintain a stable phenotype for long periods in microplates offers a great advantage for large scale screening for compound toxicity. Further development of this model, for example by incorporating fluorescent reporters of specific cell stress pathways offers additional scope for improving toxicity testing in the future.

LIST OF ABBREVIATIONS

2D	Two-dimensional
3D	Three-dimensional
ADME	Absorption, distribution, metabolism and excretion
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
ARE	Antioxidant responsive elements
ATP	Adenosine triphosphate
CAR	Constitutive androstane receptor
CLF	Cholyl-lysyl-fluorescein
CYP450	Cytochrome P-450
DEG	Differentially expressed genes
DILI	Drug induced liver injury
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECM	Extracellular matrix
FMO5	Flavin Containing Monooxygenase 5
FXR	Farnesoid X receptor
G6PC	Glucose-6-Phosphatase
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HNF4A	Hepatocyte Nuclear Factor 4
HO-1	Heme oxygenase 1
HSP40	Heat shock protein 40
iPSC	induced pluripotent stem cells
LC-MS	Liquid chromatography – mass spectrometry
LPS	Lipopolysaccharide
LXR	Liver X receptor
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
NF-κB	Nuclear factor kappa B
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PAS	Periodic acid Schiff's reaction
PBS	Phosphate buffered saline
PCLS	Precision cut liver slices
PTEC	Proximal tubular epithelial cells
PXR	Pregnane X receptor
ROS	Reactive oxygen species
RXR	Retinoid X receptor
TNFα	Tumor necrosis factor α

CURRICULUM VITAE

Sreenivasa Chakravarthy Ramaiahgari was born on 19th November 1981 in Pulivendula, India. Fascinated by the discoveries in biotechnology, he chose to pursue a Bachelor's degree in Biotechnology at Bangalore University, Bangalore, India. During this time he also attended a practical training course in Genetic Engineering at Jain University, Bangalore, India. His first tissue culture experience comes from his Bachelor's internship at University of Agricultural Sciences, Bangalore where he gained practical hands on experience with plant tissue culture methods. His enthusiasm further drove him to pursue Master's degree in Biotechnology at University of Abertay Dundee, Scotland, UK. He did his masters internship at Roslin Institute, Edinburgh, UK - the lab famously known for first mammalian cloning. He worked in the Department of Genetics and Genomics investigating molecular mechanisms associated with PRRS viral infection in pigs under the supervision of Dr. Ait-Ali and Prof. Archibald. His work at Roslin Institute assisted a publication; inspired by the project he continued working with the same group for another 6 months after his Masters degree. Later, he joined BioReliance, Glasgow, UK; where he was actively involved in testing various biological products for viral clearance in compliance with the requirements of the UK and German GLP Regulations, the US FDA Good Laboratory Practice Regulations (21 CFR 58), the Japanese GLP standard and the OECD principles of Good Laboratory Practice. After nearly 3 years at BioReliance, he started his PhD research at Division of Toxicology, Leiden Academic Center for Drug Research (LACDR)/ Leiden University under the supervision of Dr. Leo Price and Prof. Bob van de Water. His PhD research involved developing advanced *in vitro* models for studying drug-induced toxicity. He received prestigious Bo Holmstedt Memorial Foundation (BHMF) award at Eurotox 2013 meeting in Switzerland for his research work describing a feasible method for the solution of a toxicological problem under maximum respect to the 3R-principle (Reduce, Refine, Replace animal testing). He is quite interested in improved *in vitro* methodologies and the promise it holds for the future of *in vitro* studies. He started a information website - 3DCELLBIO.COM – which brings together current research on advanced *in vitro* methods; and creates open forums for scientific discussions- mainly focusing on Toxicology.

LIST OF PUBLICATIONS

A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies
Ramaiahgari SC, den Braver MW, Herpers B, Terpstra V, Commandeur JN, van de Water B, Price LS.
Archives of Toxicology 2014; 88(5): 1083-95.

A screen for apoptotic synergism between clinical relevant nephrotoxicant and the cytokine TNF-alpha
Benedetti G*, **Ramaiahgari SC***, Herpers B, van de Water B, Price LS, de Graauw M.
Toxicology In Vitro 2013; 27(8): 2264-72.

Epac-Rap Signaling Reduces Oxidative Stress in the Tubular Epithelium
Stokman G, Qin Y, Booij TH, **Ramaiahgari SC**, Lacombe M, Dolman ME, van Dorenmalen KM, Teske GJ, Florquin S, Schwede F, van de Water B, Kok RJ, Price LS.
Journal of American Society of Nephrology (In Press).

cAMP signalling protects proximal tubular epithelial cells from cisplatin-induced apoptosis via activation of Epac
Qin Y, Stokman G, Yan K, **Ramaiahgari SC**, Verbeek F, de Graauw M, van de Water B, Price LS.
British journal of pharmacology 2012; 165-4b: 1137-50.

Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes
Zhang Y, Moerkens M, **Ramaiahgari SC**, de Bont H, Price L, Meerman J, van de Water B.
Breast cancer research 2011; 13(3): R52.

Functional analysis of the porcine USP18 and its role during porcine arterivirus replication
Ait-Ali T, Wilson AW, Finlayson H, Carre W, **Ramaiahgari SC**, Westcott DG, Waterfall M, Frossard JP, Baek KH, Drew TW, Bishop SC, Archibald AL.
Gene 2009; 439(1-2): 35-42.

3D cell models (Hepatotoxicity screening on in vitro models and role of 'Omics) Book chapter in Toxicogenomics – based cellular models – Alternatives to animal testing for safety assessment (Edited by Jos Kleinjans) (2014)
Ramaiahgari SC and Price LS.

3D cell culture improves liver-specific characteristics of HepG2 cells: a gene expression analysis-based comparison of different in vitro hepatocyte models
Ramaiahgari SC, Coonen M, Meerman JHN, Jennen D, van de Water B, van Delft JH and Price LS.
Manuscript in preparation

Systemic comparison of diclofenac induced gene expression changes in diverse in vitro and in vivo models and species
Ramaiahgari SC, Wink S, Hadi M, John Meerman, Luijten M, Groothuis GM, van de Water B and Price LS.
Manuscript in preparation

* These authors contributed equally to the study.