

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/37129> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Wink, Steven

Title: Systems microscopy to unravel cellular stress response signalling in drug induced liver injury

Issue Date: 2015-12-22

Samenvatting

Waarom dit onderzoek

Veel geneesmiddelen, met name antibiotica-, ontstekingsremmers-, antischimmel-, anti-psychose- en antikankergeneesmiddelen en bepaalde alternatieve geneeskruiden kunnen bij sommige individuen leiden tot ernstige leverschade. De lever is het orgaan dat het meest beschadigd raakt door toxische verbindingen omdat al de opgenomen voedselcomponenten uiteindelijk via de lever in de bloedcirculatie komen. Bovendien is de lever verantwoordelijk voor het metaboliseren en detoxificeren van schadelijke verbindingen. Soms leidt metabolisme juist tot de vorming van reactieve metabolieten afkomstig van een anders onschadelijke verbinding.

De door medicijn-geïnduceerde leverschade is globaal in zeven verschillende typen te onderscheiden: 1) Fibrose: cellen genaamd “hepatische stellaat cellen” maken bindweefsel met als doel de lever te repareren maar de vorming hiervan kan verstoord worden door sommige geneesmiddelen. 2) Cirrose of leverontsteking: langdurige leverschade of problemen met de productie van bindweefsel in de lever kan leiden tot overmatig veel littekenweefsel. Dit wordt cirrose genoemd en is meestal het gevolg van een chronische primaire pathologie. 3) Cholestase: problemen met galzuur metabolisme of transport in de lever leiden tot stapeling van galzuren in de lever en tot schade in de levercellen. 4) Steatose/ steatosis hepatis: als een probleem met metabolisme of transport van vetten plaatsvindt waardoor er een ophoping van deze vetten (voornamelijk triglyceriden) ontstaat, heet dit steatose. Wanneer er als gevolg hiervan ontstekingen in de lever plaatsvinden dan wordt dit steatosis hepatis genoemd. Het vaakst komt deze leveraandoening door alcoholmisbruik maar ook geneesmiddelen kunnen deze pathologie induceren. 5) Fosfolipidose: een vorm van steatose met ophoping van fosfolipiden als gevolg van problemen met liposomale verwerking van vet. 6) Necrose: celdood van levercellen op een ongecontroleerde wijze. Tot slot 7) Apoptose: celdood van levercellen op een door cellen gecontroleerde wijze.

Blootstelling aan sommige geneesmiddelen leidt tot iets mildere vormen van leverschade, zoals steatose en cholestase, dat pas op de langere termijn tot cirrose kan leiden. Echter, sommige geneesmiddelen die tot massale leverceldood leiden, in de vorm van necrose of apoptose, zorgen voor imminente ernstige complicaties waarbij een snelle levertransplantatie nodig is.

Met behulp van allerlei methoden, met cellen (*in vitro*), met bepaalde proefdieren (*in vivo*) en klinisch onderzoek, proberen wetgever en farmaceutische bedrijven te voorkomen dat dergelijke leverschade-inducerende geneesmiddelen op de markt komen. Soms gebeurt het dat geneesmiddelen op de markt komen die bij sommige individuen (ernstige) leverschade veroorzaken. Dit gebeurt bij één op enkele tot vele duizenden patiënten, afhankelijk van het geneesmiddel. Een dergelijke zeldzame ongewenste reactie op een geneesmiddel noemt men een idiosyncratische reactie. De oorzaak van idiosyncratische reacties is niet helemaal bekend en verschilt van individu tot individu (*i.e.* genetisch). Verschillen in milieuomstandigheden en externe factoren, zoals predispositie door activatie van het immuunsysteem, zijn in de literatuur vaak genoemde oorzaken. Naast de zogenaamde idiosyncratische reacties zijn er de algemene

levertoxische verbindingen. Deze toxiciteit is concentratie-afhankelijk en daarom beter te voorspellen als de toxiciteit eenmaal in mensen is geconstateerd. Echter, het ontwikkelen van geneesmiddelen is zeer kostbaar (dit kan oplopen tot meer dan een miljard euro en hoe verder in de ontwikkeling een medicijn is voordat de toxiciteit ervan duidelijk wordt, hoe hoger de kosten zullen zijn). Het is daarom zeer wenselijk voor de farmaceutische industrie, de consumenten en ook de gehele gezondheidszorg om nauwkeurig en vroeg in de ontwikkeling van een medicijn (lever) toxiciteit te kunnen voorspellen. Bovendien is het zeer gewenst deze vroege voorspellingen met behulp van *in vitro*-methoden te doen. Deze methoden kunnen namelijk vroeg in de ontwikkeling van nieuwe kandidaat-geneesmiddelen gebruikt worden wanneer het aantal nog zeer groot is. Dit doordat het mogelijk is 'high-throughput' te werken, in tegenstelling tot onderzoek met dierproeven en klinisch onderzoek.

Ons idee voor het bijdragen van het voorspellen van leverschade van nieuwe geneesmiddelen.

Nieuwe wetenschappelijke methoden en inzichten hebben geleid tot een beter begrip van hoe de verschillende cellen in ons lichaam reageren op bepaalde verbindingen. Met technieken zoals 'microarray chips', 'proteomics' en 'metabolomics' die respectievelijk genen, eiwitten en metabolieten meten zijn de belangrijkste signaalroutes die cellen gebruiken om zichzelf in leven te houden of juist celdood initiëren in kaart gebracht. Verschillende essentiële signaaltransductieroutes die hieruit zijn voortgekomen zijn o.a. de adaptieve stress response signaaltransductie cascade; 1) de Nrf2-gemedieerde oxidatieve stress signaaltransductie cascade (Nrf2-cascade), 2) de endoplasmatisch reticulum ongevouwen eiwitten signaaltransductie cascade (ER-cascade) en 3) de p53-gemedieerde DNA-schade signaaltransductie cascade (DNA-cascade). Naast de adaptieve stress responsen is er de NF- κ B gemedieerde immuun-signaltransductie cascade (NF- κ B-cascade), dat een belangrijke rol bij celoverleving speelt.

De adaptieve stress response signaaltransductie cascades zijn evolutionair behouden celmechanismen die zorgen voor een endogene fysiologisch intracellulair milieu, zodat de cellen goed kunnen blijven functioneren als onderdeel van een orgaan.

Het is belangrijk dat cellen deze adaptieve mechanismen hebben om stress te neutraliseren dat wordt veroorzaakt door geneesmiddelen. Echter, het is van belang te beseffen dat de primaire rol van deze adaptieve mechanismen is om fysiologisch geïnduceerde stress te neutraliseren veroorzaakt door onder andere beweging, eten of ziekte. Zo zorgt de Nrf2-cascade bij oxidatieve stress ervoor dat er antioxidanteiwitten tot expressie komen om o.a. vrije radicalen en alkylerende verbindingen op te ruimen en daarmee de beschadiging van macromoleculen, zoals eiwitten en DNA, maar ook beschadiging van celmembranen door lipide peroxidatie, tegen te gaan. De ER-cascade is een cellulair adaptief mechanisme dat bij problemen met het vouwen van aminozuurketens tot functionele eiwitten, in het endoplasmatisch reticulum, geactiveerd wordt. Deze activatie leidt tot het tot expressie brengen van meer zogenaamde chaperones. Deze chaperones helpen bij het op de juiste manier vouwen van de aminozuurketens, zodat het risico op de vorming van eiwitaggregaten verkleind wordt. Bovendien wordt bij de activatie van de ongevouwen eiwit response translatie gestopt. Bij langdurige activatie wordt de cel aangestuurd om in apoptose te gaan. Tot slot zorgt de DNA-cascade ervoor dat er bij schade aan het DNA

eiwitten tot expressie worden gebracht die de DNA-schade proberen te repareren. Daarnaast wordt celdeling een halt toegeroepen. Pas als het DNA gerepareerd is zal de cel weer kunnen delen.

Echter in tegenstelling tot cellulaire aanpassing en overleving is het ook belangrijk dat cellen de beslissing kunnen nemen om in apoptose te gaan. Dit om de gezondheid van een orgaan als geheel niet te belemmeren. Als een cel DNA-schade, eiwit aggregaten of andere beschadigingen na celdeling doorgeeft leidt dat tot ernstige problemen voor een orgaan en daarmee de gezondheid van het individu. De essentiële signaaltransductie cascade die bij de overleving van een cel een rol speelt is de NF- κ B-cascade. Deze signaal cascade zorgt onder fysiologische omstandigheden ervoor dat een individuele cel niet in apoptose gaat. Echter kan bij bepaalde signalen, bijvoorbeeld na langdurige activatie van de ER-cascade of bij een virale of bacteriële infectie, dit er voor zorgen dat immuuncellen het paracrien cytokine TNF α signaal uitscheiden. Deze TNF α activeert de TNF α -receptor waardoor de NF- κ B-cascade verstoord wordt.

De verschillende signaaltransductie-routes zorgen tezamen dus voor adaptatie en herstel nadat het biochemisch evenwicht is verstoord. Mochten de adaptieve stress response cascades het evenwicht niet kunnen herstellen, omdat de biochemische perturbatie of schade te groot was, dan zorgt o.a. de TNF α -receptor-route ervoor dat de cel in apoptose gaat.

Onze hypothese is dan ook dat alle soorten cellulaire schade, veroorzaakt door geneesmiddelen of andere verbindingen, gedetecteerd worden en leiden tot activatie van verschillende repareermechanismen in de cel.

Wij monitoren in levende cellen gedurende een bepaalde periode deze adaptieve stress cascades en de NF- κ B-cascade gebruikmakend van fluorescerende eiwitten, de zogenaamde 'Green fluorescent protein' (GFP). Deze eiwitten zijn gefuseerd met eiwitten die zich op cruciale posities in de signaaltransductie cascades bevinden. De gefuseerde eiwitten zijn in een van de lever afgeleid celtype gebouwd, de HepG2 cellijn. Deze 'HepG2 reporter' cellijnen worden in incubatiebakjes gekweekt en blootgesteld aan verbindingen die ingedeeld zijn in de mate die deze lever-schade induceren. Met behulp van geautomatiseerde confocale microscopen hebben wij vervolgens de cellen gedurende 24 uur gevolgd, met als gevolg heel veel plaatjes in de tijd (filmpjes) met daarbij ook de mogelijkheid voor het onderscheiden van allerlei (morfologische) fenotypen na blootstelling aan de chemische stoffen. Deze fenotypen zijn bijvoorbeeld; de grootte van de kern, de migratiesnelheid, wanneer er bij welke concentratie de genoemde cascades worden geactiveerd en wanneer er bij welke concentratie de cellen in apoptose dan wel necrose gaan. Deze methode en de beargumentering van onze hypothese staat beschreven in hoofdstuk 2. In hoofdstuk 3 worden deze HepG2 reporter cellijnen getest op referentieverbindingen waarvan we weten wat voor type cellulaire schade deze induceren. Zo kon de gevoeligheid en selectiviteit van verschillende HepG2 reporter cellijnen geverifieerd worden. In hoofdstuk 4 is gedetailleerd onderzoek gedaan naar de invloed van de Nrf2-cascade en ER-cascade in de context van de immuun-cel cytokine TNF α , om de oxidatieve stress en ER-cascade activatie onder simulatie van een (bijvoorbeeld) infectie te simuleren. Hoofdstuk 5 sluit aan op ditzelfde principe en beschrijft het onderzoek naar de interactie tussen de NF- κ B-cascade en Nrf2-cascade in de context van geneesmiddelen die leverschade induceren. Daarnaast is er een groep HepG2 reporter cellijnen gebruikt om een set van 180 geneesmiddelen en andere verbindingen te testen. De resultaten van dit microscopisch-fenotypisch onderzoek zijn gecorreleerd aan de mate waarin geneesmiddelen

leverschade induceren. Tot slot is de ontwikkeling van een gebruikersvriendelijke browser-gebaseerde interface voor het analyseren van de kwantitatieve data resulterend van de geautomatiseerde confocale microscopen beschreven in hoofdstuk 7.

Resultaten van dit onderzoek

Hoofdstuk 3: Hoog-gehalte beelden gebaseerde BAC-GFP adaptieve stress responsen voor de evaluatie van de toxiciteits-risico van chemicaliën.

Als eerste zijn de HepG2 reporter cellijnen gekloond door aan eiwitten die op cruciale locaties in de adaptieve stress cascades gepositioneerd zijn een fluorescent eiwit te fuseren. Vervolgens is het signaal detectie niveau (de gevoeligheid) en selectiviteit, voor ofwel oxidatieve stress, ofwel endoplasmatisch reticulum stress, ofwel DNA schade stress getest bij drie verschillende concentraties van een set referentie verbindingen waarvan het type toxiciteit bekend is. Het bleek dat de HepG2 reporter cellijnen in een concentratie afhankelijke wijze reageerden op de referentie verbindingen. Daarnaast bleken ze gevoelig genoeg om detectie mogelijk te maken en selectief aangezet te worden door hun corresponderende stress inducerende verbindingen. Bovendien bleek door het gebruik van microscopie-techniek de tijdsresolutie hoog genoeg zodat nauwkeurig bepaald kon worden in welke volgorde de adaptieve stress response cascades geactiveerd worden. Dit maakte het mogelijk de primaire stress type van de hierop volgende secundaire stress te scheiden. Tot slot is naar het RNA-niveau gekeken onder vergelijkbare condities in een publiek beschikbare micro-array dataset gebaseerd op primair humane hepatocyten. Primair humane hepatocyten worden beschouwd als een 'gouden standaard' model omdat het geïsoleerde levercellen van donoren zijn en daarom meer eigenschappen bezitten van een fysiologische lever. Het bleek dat de GFP gefuseerde eiwitten van HepG2 reporter cellijnen op een vergelijkbare manier reageerden ten opzichte van het RNA niveau van de primair humane hepatocyten.

Hoofdstuk 4: Geneesmiddelen-geïnduceerde endoplasmatisch reticulum- en oxidatieve stress responsen predisponeren naar TNF α geïnduceerde hepatotoxiciteit.

In dit hoofdstuk zijn de onderliggende mechanismen van de synergistische respons van hepatotoxische geneesmiddelen en TNF α onderzocht gebruikmakend van een unieke combinatie van geïntegreerde transcriptomics en RNA-interferentie. Genexpressie analyse van HepG2 cellen, primaire humane- en muis hepatocyten en dunne menselijke leverplakjes demonstreerden dat specifieke activatie van de ER-cascade geschiedde door middel van activatie van de ATF4 transcriptie factor. Door gebruik te maken van RNA-interferentie, imaging en de HepG2-reporter cellijnen bleek een bepaalde arm van de ER-cascade, namelijk PERK-CHOP, cruciaal te zijn voor het geneesmiddel-TNF α geïnduceerde synergistische celdood. Oxidatieve stress zorgde voor een additionele impuls voor HepG2 celdood. Echter beïnvloedde deze oxidatieve stress niet de mate van ER-cascade activatie. De translatie inhibitie marker EIF4A1 bleek wel cruciaal voor de activatie van CHOP en daarmee het geobserveerde geneesmiddel/TNF α geïnduceerde celdood.

Hoofdstuk 5 Activatie van de Nrf2-cascade door intrinsieke hepatotoxische geneesmiddelen correleert met suppressie van NF- κ B-cascade activatie en predisponeert naar TNF α -geïnduceerde cytotoxiciteit.

Analyse van een grote transcriptomics dataset van primaire humane hepatocyten leidde tot het inzicht dat veel geneesmiddelen die ernstige leverschade kunnen veroorzaken ook een sterke Nrf2-cascade response kunnen induceren. Bovendien bleek dat deze Nrf2-cascade activatie correleerde met een lagere mate van NF- κ B activatie. Dit inzicht is verder uitgewerkt gebruikmakend van een set van HepG2 reporters voor deze twee signaaltransductie cascades. Inderdaad, aan de hand van de tijdprofielen van activatie van deze twee cascades bleek dat TNF α geïnduceerde NF- κ B activatie geremd werd door (met name sterk-leverschade inducerende) geneesmiddelen die een sterke Nrf2-response activeerden. Omdat NF- κ B activatie belangrijk is voor cellen om te overleven bij TNF α stimulatie, zou de suppressie van deze signaaltransductie cascade een mogelijke verklaring kunnen zijn voor de synergistische celdood geïnduceerd door geneesmiddel/TNF α . Dankzij onze imaging-technieken met behulp van de HepG2-reporters was het mogelijk het oscillatoire gedrag van NF- κ B te kwantificeren. Het bleek dat de remming van de NF- κ B activatie bestond uit een vertraging van het herhaalde transport van NF- κ B naar de kern. Daarom stellen wij voor deze vertraging als een bio-marker mee te nemen in toekomstige toxiciteit onderzoeken.

Hoofdstuk 6 Geautomatiseerde 'live'-cel imaging van adaptieve stress responsen voor de bepaling van geneesmiddel- geïnduceerde leverschade.

Gebruikmakend van drie HepG2-reporter cellijnen, namelijk; Srxn1 voor oxidatieve stress, CHOP voor ER-stress geïnduceerde ongevouwen eiwit response-activatie en p21 voor DNA-schade stress, is een groot aantal leverschade inducerende geneesmiddelen op stress-response activatie en additionele fenotypen die het niveau van toxiciteit laten zien weergegeven. Bijna de helft van alle leverschade inducerende geneesmiddelen activeerden een van de drie stress-responsen. Het merendeel van de geactiveerde stress-responsen bestond uit de Nrf2-cascade, gevolgd door de ER-cascade en een klein deel DNA-cascade activatie. Concentratie- en tijdresponsen van de stress response activatie gaf mechanistische informatie over het type stress, primaire/secundaire stress en bij welke concentraties dit geschiedde. Een belangrijke observatie, de gehele dataset in ogenschouw nemend, is dat onderzoek naar slechts enkele adaptieve stress cascades al een goede indicatie geeft over de potentieel tot ernstige leverschade die veroorzaakt kan worden door een verbinding. Dit onderbouwt ons concept dat toxiciteit mede veroorzaakt wordt door het tekortkomen van repareermechanismen en dat het kwantitatief meten van deze repareermechanismen gebruikt kan worden voor de voorspelling van het mogelijk optreden van toxiciteit. Aan de andere kant waren er geen repareermechanismen in werking gezet bij ongeveer de helft van alle geteste verbindingen en een derde van de leverschade inducerende geneesmiddelen. Dit is mogelijk omdat niet alle adaptieve repareermechanismen door ons onderzocht zijn in onze screening. Een andere verklaring kan zijn dat ons celmodel niet volledig representatief is. Wij zijn dan ook hard bezig met het maken van additionele reporter cellijnen die o.a. vet en galzuur metabolisme weergeven. Daarnaast proberen we deze reporters in te bouwen in andere celtypen.

Wij verwachten dat de in dit project ontwikkelde paneel van HepG2-reporters en afgeleide kwantitatieve data als 'biologische vingerafdruk' gebruikt kan worden voor het toekomstig 'high-throughput' screenen van verbindingen op hun potentie om levertoxiciteit te veroorzaken bij de mens.