



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **TNFalpha-signaling in drug-induced liver injury**

Fredriksson, L.E.

### **Citation**

Fredriksson, L. E. (2012, December 6). *TNFalpha-signaling in drug-induced liver injury*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20257>

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/1887/20257>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

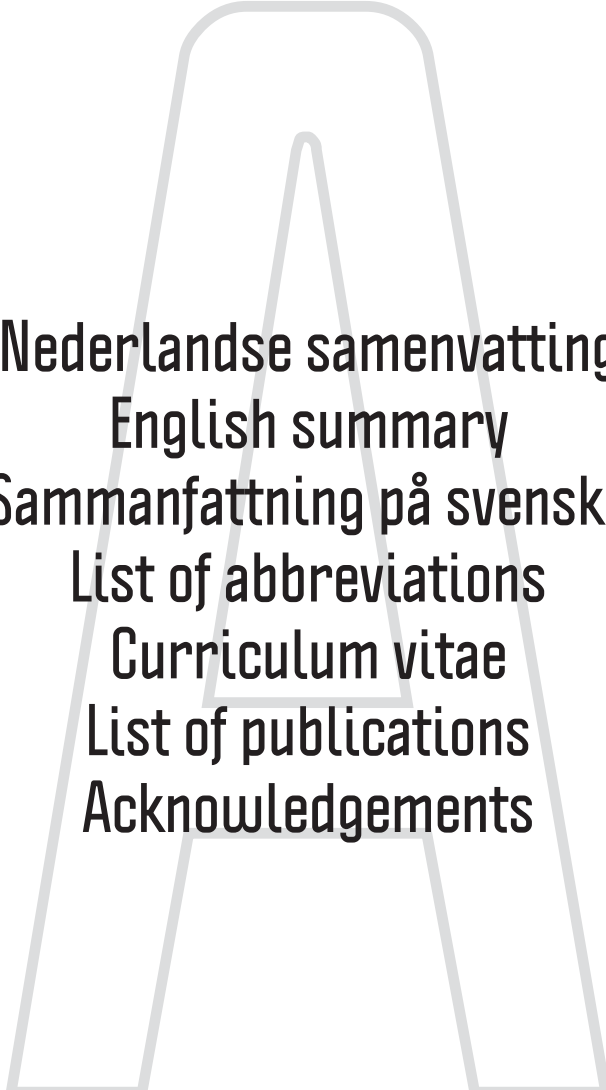


The handle <http://hdl.handle.net/1887/20257> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Fredriksson, Lisa Emilia

**Title:** TNFalpha-signaling in drug-induced liver injury

**Issue Date:** 2012-12-06



**Nederlandse samenvatting**  
**English summary**  
**Sammanfattning på svenska**  
**List of abbreviations**  
**Curriculum vitae**  
**List of publications**  
**Acknowledgements**



# NEDERLANDSE SAMENVATTING

Bijwerkingen van medicijnen zijn een groot probleem voor zowel de maatschappij als voor de farmaceutische industrie. Bij ernstige bijwerkingen zijn de kosten hoog; voor de farma-bedrijven in de financiële zin omdat hun product (vroegtijdig) van de markt gehaald moet worden en voor de maatschappij omdat de betrokken individuen mogelijk additionele behandelingsmethodes moeten ondergaan. Dit is nog afgezien van de last voor de patiënten in kwestie.

Leverschade door medicijngebruik is de meest voorkomende bijwerking en zo ook onderliggende reden voor het verwijderen van een medicijn. Dit type bijwerking, in het engels afgekort tot DILI (drug-induced liver injury), schaadt de lever in die zin dat de lever ophoudt met functioneren, met mogelijk dodelijke gevolgen. De lever is één van de meest kwetsbare organen bij medicijngebruik vanwege diens functie: het bloed, dat langs de darmen stroomde, ontdoen van lichaamsvreemde stoffen, inclusief medicijnen. Daarbij worden deze stoffen omgezet naar makkelijk af te voeren stofjes die uitgescheiden kunnen worden via de urine of de gal. Dit omzetten gaat vaak goed en het medicijn wordt navenant afgevoerd. Echter, soms worden ook schadelijke nevenproducten gevormd die de lever kunnen schaden. Of en waarom ernstige leverschade optreedt lijkt af te hangen van het individu.

Voor een aantal medicijnen kan DILI worden verklaard. Paracetamol bijvoorbeeld wordt gedeeltelijk omgezet tot een reactief bijproduct, wat normaliter efficiënt wordt weggevangen door de verdedigingsmechanismen in de lever zolang de inname niet overmatig is, anders leidt het tot leverfalen met dodelijke afloop. Het bijproduct kan worden weggevangen en daarom is de ernstige schade relatief makkelijk te voorkomen. Echter, de oorzaak en het mechanisme van DILI door andere medicijnen is vaak nog niet bekend. Omdat DILI niet vaak voorkomt maar wel zeer ernstig kan zijn, is het wenselijk om te weten te komen hoe dit proces zich ontwikkelt om het uiteindelijk te kunnen voorkomen. Een beter inzicht in de toedracht leidt mogelijk tot testsystemen die gebruikt kunnen worden door de farmaceutische industrie om te voorkomen dat dit type schadelijke medicijnen nooit op de markt gebracht worden. Mijn proefschrift gaat over dit belangrijke probleem; waarom treden deze onverklaarbare bijwerkingen op in de lever en welke testsystemen kunnen we opzetten om nieuwe kandidaat-medicijnen op veiligheid te testen?

Het is al bekend dat niet alleen het omzetten van of het metabolisme van een stof de lever kan beschadigen, maar ook dat het immuunsysteem een belangrijke rol speelt in dit proces. Met deze kennis hebben we in **Hoofdstuk 2** de synergie-hypothese getest: het tegelijkertijd blootstellen van gekweekte levercellen aan een stof die DILI veroorzaakt en een cytokine die ontstekingen bevordert, leidt tot meer celdood dan beide componenten an sich. We testten deze hypothese voor de modelstof diclofenac, de niet-schadelijke controlestof naproxen en de cytokine TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ . Met dit model ontdekten we dat TNF $\alpha$  inderdaad de celdood bevordert in aanwezigheid van diclofenac, maar niet op zichzelf of in aanwezigheid van naproxen. Dit effect bleek in gang

te worden gezet door diclofenac, dat de levercellen gevoelig maakt voor de schaduwzijde van TNF $\alpha$ , en niet andersom. TNF $\alpha$  stimuleert namelijk overlevingsmechanismen binnen een cel, maar tegelijkertijd ook celdood. De balans tussen deze tegenovergestelde signaalcascades helt normaliter over naar overleving, maar deze wordt dusdanig verstoord door diclofenac dat de celdood-respons de overhand krijgt, met meer leverschade tot gevolg.

Als medicijnen worden omgezet tot metabolieten leidt dit tot stress in levercellen. In **Hoofdstuk 3** laten we een combinatie van drie microscopie-gebaseerde benaderingen zien om medicijnen op leverschade potentie te testen. Blootstelling aan medicijnen kan oxidatieve stress induceren. Daarom testten we eerst een aantal stoffen, inclusief die medicijnen die onverklaarbare leverschade kunnen veroorzaken, in een reporter systeem voor oxidatieve stress. Hiermee konden we aantonen dat het gros van de stoffen, zo ook diclofenac, oxidatieve stress veroorzaakt. Dit drukt mogelijk de overlevingsmechanismen die normaliter aangezet worden na TNF $\alpha$ . Daarom onderzochten we de dynamiek van de signaal-cascade volgend op TNF $\alpha$  stimulatie in een toegewijde assay. De mate waarop oxidatieve stress werd geïnduceerd voorspelde echter niet of een medicijn de respons op TNF $\alpha$  negatief zou beïnvloeden. Desalniettemin, zodra we de verkregen informatie combineerden met een derde assay die de celdood meet door toedoen van een combinatie van cytokine en medicijn, vonden we dat de stoffen die zowel oxidatieve stress induceerden en de TNF $\alpha$ -afhankelijke overlevingsresponsen negatief beïnvloedden juist degenen zijn die tot meer celdood leiden in combinatie-condities. Hiermee konden we aantonen dat een combinatie van meetmethodes ingezet kan worden om het lever-schadelijke potentiëel van medicijnen te indexeren.

Omdat het optreden van oxidatieve stress niet voorspellend was voor het optreden van leverschade na medicijn en cytokine, is het aannemelijk dat ook andere stress-routes een belangrijke rol spelen. In **Hoofdstuk 4** hebben we dit aangepakt door te kijken naar het genexpressie patroon dat door blootstelling aan DILI-gerelateerde medicijnen wordt geïnduceerd. De focus lag op twee medicijnen waarvan de celdood flink versterkt wordt door TNF $\alpha$ : diclofenac en carbamazepine. Met software die signaalcascades helpt analyseren hebben we de verschillende typen celstress nagelopen. We konden bevestigen dat deze twee stoffen oxidatieve stress induceren en vonden vervolgens ook dat beide de eiwitproductie beïnvloeden. Vooral een specifiek gen, EIF4A1, werd sterk aangezet na blootstelling aan diclofenac en carbamazepine, maar minder door stoffen waarbij TNF $\alpha$  de celdood niet specifiek verergerde. Wat verder interessant is, is dat het specifiek voorkomen dat dit eiwit aangemaakt kan worden voorkomt de celdood. Dit toont aan dat dit eiwit zeer belangrijk is bij de versterking van de celdood na medicijn-blootstelling door TNF $\alpha$ . Mogelijkerwijs kan dit eiwit dienen als merker voor het leverschadelijk effect van stoffen. Anders zou het ook kunnen dienen als een additionele merker voor translationele stress in een microscopische setup vergelijkbaar met het oxidatieve stress reporter-systeem zoals beschreven in hoofdstuk 3, om medicijnen te kunnen monitoren op ernstig DILI-potentiëel.

In hoofdstuk 2 lieten we zien dat diclofenac een verschuiving veroorzaakt in de

overlevingsrespons na TNF $\alpha$  om uit te monden in celdood. Diclofenac voorkomt namelijk de gerichte activiteit van de transcriptie-factor NF- $\kappa$ B waarmee de stof voorkomt dat de genen die voor overleving zorgen niet (goed) aangezet worden. In **Hoofdstuk 5** hebben we systematisch de rol van individuele genen getest in de dynamiek van NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B dient in een voorgeprogrammeerde cyclus de kern in en uit te gaan om de juiste genetische respons aan te zetten. We konden enkele nieuwe eiwitten identificeren die deze locatie-wisseling beïnvloeden en ook aantonen dat dit direct invloed heeft op de celdood. Het uitbreiden van de kennis rondom NF- $\kappa$ B regulatie is niet alleen van belang bij het begrijpen van bijwerkingen, maar ook op gebied van celgroei en ontstekingsreacties, processen waarbij NF- $\kappa$ B een belangrijke rol speelt en kennis bijdraagt bij het begrijpen van kanker en chronische ontstekingsziekte.

Samenvattend, het werk dat in dit proefschrift is gepresenteerd is dieper ingegaan op hoe bijwerkingen optreden in de lever en focuste op de rol van ontstekingsreacties in dit proces. De kennis die we hebben verzameld kan mogelijk ingezet worden om nieuwe en betere testmethodes voor toxiciteit te ontwerpen en ontwikkelen om in te zetten voor medicijn-ontwikkeling. Verder denk ik dat het werk dat in hoofdstuk 5 staat, aangaande NF- $\kappa$ B, bij zal dragen aan de kennis op andere onderzoeksgebieden, zoals kanker.

