



Universiteit
Leiden
The Netherlands

High throughput microscopy of mechanism-based reporters in druginduced liver injury

Hiemstra, S.W.

Citation

Hiemstra, S. W. (2016, November 9). *High throughput microscopy of mechanism-based reporters in druginduced liver injury*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/43990>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/43990>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/43990> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Hiemstra, Steven

Title: High throughput microscopy of mechanism-based reporters in drug-induced liver injury

Issue Date: 2016-11-09

Samenvatting

Medicijnen kunnen in zeldzame gevallen leiden tot ernstige leverschade. De lever is een complex orgaan, dat verantwoordelijk is voor de productie van gal, het op peil houden van het glucose gehalte in het bloed en de omzetting van (schadelijke) stoffen. Om het glucose gehalte in het bloed op peil te houden zet de lever overvloedig glucose om in glycogeen, wat in tijden van glucose tekort weer kan worden omgezet naar glucose. Om deze reden is er een bloedvat van de darmen naar de lever, de poortader, die voedingsstofrijk bloed naar de lever brengt. Via deze route worden ook niet lichaamseigen stoffen als medicijnen naar de lever getransporteerd. In de lever worden deze stoffen dan omgezet om te kunnen worden uitgescheiden. Tijdens de omzetting kunnen er reactieve verbindingen ontstaan die schade kunnen veroorzaken aan de lever. Deze factoren leiden tot een verhoogde kans op het ontstaan van medicijn geïnduceerde leverschade.

Tijdens de ontwikkeling van nieuwe medicijnen worden deze intensief getest op hun potentie om leverschade te veroorzaken. Tijdens de eerste fase van preklinische tests worden de nieuwe medicijnen getest in verschillende celweek methodes en in dierproeven. Daarna worden de nieuwe medicijnen getest op mensen in klinische trials. Als deze tests negatief zijn voor een toxisch effect en positief voor het gewenste ziekte bestrijdende effect, wordt dit nieuwe medicijn toegelaten tot de markt. In zeer zeldzame gevallen ontwikkelen sommige patiënten ernstige leverschade die zonder levertransplantatie eindigen in de dood. Doordat dit in zeer zeldzame gevallen (één op de vele duizenden patiënten) voorkomt, is het heel lastig te voorspellen welke medicijn dit effect zal hebben. Waarom deze reactie in juist deze patiënten optreedt kan veel verschillende oorzaken hebben als genetische verschillen, milieufactoren en externe omstandigheden. Omdat het dus een belangrijk klinisch probleem is wat kan leiden tot het overlijden van patiënten en de farmaceutisch industrie veel geld kost (de kosten voor het ontwikkelen van een medicijn kunnen oplopen tot meer dan een miljard euro), is het belangrijk dat er meer onderzoek wordt gedaan naar het ontwikkelen van tests om leverschade beter te voorspellen en naar hoe deze leverschade in die zeldzame gevallen leidt tot leverschade.

De cel heeft allerlei mechanismen om verschillende soorten stress te kunnen ondervangen en de oorzaak van de stress onschadelijk te kunnen maken. In dit zogeheten adaptatie proces spelen adaptieve stress responsen een belangrijke rol. De belangrijkste adaptieve stress responsen zijn de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons, de ongevouwen eiwitten respons, de p53 gemedieerde DNA schade respons en de NFkB gemedieerde immuun respons. De stress responsen zorgen er niet alleen voor dat de cellulaire stress onschadelijk wordt gemaakt. Op het moment dat de schade aan de cel te groot is om gerepareerd te worden gaat de cel in apoptose (geprogrammeerde celdood). Op deze manier kan ervoor worden gezorgd dat het weefsel niet veel schade oploopt als er een cel doodgaat. Ernstige leverschade treedt op als de stress dusdanig erg is dat massaal celdood optreedt. Omdat er heel veel variatie in de reactie van mensen op medicijnen is, is onze hypothese dat wat in de ene patiënt zorgt voor de ontwikkeling van leverschade in de andere patiënt alleen leidt tot het aanschakelen van stress

responsen. Het meten van de activatie van deze stress responsen zou dan indicatief zijn voor de potentie van een medicijn om leverschade te veroorzaken.

Om de voorspellende waarde van stress respons activatie te testen hebben we een panel van eiwitten gekozen die representatief zijn voor de activatie van drie stress responsen (oxidatieve stress respons, DNA schade respons en de ongevouwen eiwitten respons). Van elke stress respons is een sensor eiwit, de centrale transcriptie factor en een specifieke target gekozen die wordt geactiveerd als de transcriptie factor naar het DNA verplaatst. Met de zogenaamde bacteriële artificiële chromosoom techniek wordt een fusie eiwit in het genoom van de HepG2 lever cellijn geïntegreerd. Dit fusie eiwit is een fusie tussen het eiwit van interesse en een fluorescent eiwit. Met behulp van confocale microscopie kan de activatie van het fluorescente eiwit gedetecteerd worden en daarmee kan stress respons activatie gevolgd worden. Samenvattend: we hebben een panel van fluorescente HepG2 reporters gemaakt waardoor we gedurende een periode van 24 uur tot een paar dagen de activatie van de stress responsen kunnen volgen.

In **hoofdstuk 2** wordt beschreven hoe dit panel van HepG2 reporters is gemaakt en gekarakteriseerd. Niet alleen de fluorescente waarden kunnen worden gedetecteerd met de microscoop, door gebruik te maken van analyse programma's zijn we ook in staat deze waarden te kwantificeren. Verder laten we zien dat de reporters specifiek reageren op referentie stoffen (stoffen met een bekende werking). We besluiten het hoofdstuk door te onderzoeken of de respons van onze reporters overeen komt met de reactie van levercellen die direct uit mensen zijn geïsoleerd. Dit blijkt (deels) het geval.

In **hoofdstuk 3** wordt de activatie van drie reporters (Srxn1, oxidatieve stress; p21, DNA schade en Chop, ongevouwen eiwit respons) gedetecteerd gedurende 24 uur na het toedienen van 170 stoffen in vijf verschillende concentraties. De 170 stoffen zijn gekozen omdat het voor het grootste deel medicijnen zijn. De andere stoffen zijn controle stoffen. De gekozen medicijnen hebben een bekend effect op de markt: een grote set van de medicijnen staan bekend om het veroorzaken van leverschade, ook medicijnen die al jaren op markt zijn zonder gevallen van leverschade te veroorzaken zijn toegevoegd om te zien of deze stoffen geen activatie van stress responsen laten zien. De conclusie van dit hoofdstuk is dat er een verrijking van stress respons activatie te zien is in medicijnen die wel leverschade veroorzaken, maar dat niet alle medicijnen die wel leverschade veroorzaken stress respons activatie laten zien en niet alle medicijnen die geen leverschade veroorzaken negatief zijn voor alle stress responsen.

Een reden waarom niet alle medicijnen stress respons activatie veroorzaken kan de keuze van de cellijn zijn. We hebben voor HepG2 gekozen omdat het een goedkope, makkelijk te transfecteren cellijn is, die ook veel gebruikt wordt als eerste test in medicijn ontwikkeling. Een nadeel van HepG2 cellen is dat ze niet medicijnen kunnen omzetten. Als een medicijn dus pas toxisch is nadat het is omgezet, wordt dit niet opgepikt door ons systeem. Als HepG2 cellen in een gel gekweekt worden vormen ze een 3D cluster, waarin de capaciteit om stoffen om te

zetten (deels) terug komt. In **hoofdstuk 4** worden daarom 33 medicijnen getest op stress respons activatie in 3D. Deze medicijnen zijn geselecteerd op het feit dat ze geen respons geven in hoofdstuk 3 en bekend staan om het feit dat ze omgezet worden. Ook in dit hoofdstuk zien we een verrijking van medicijnen die wel leverschade veroorzaken ten opzichte van medicijnen die geen leverschade veroorzaken als wordt gekeken naar stress respons activatie. Een ander voordeel van 3D kweek is dat de cellen niet meer groeien. Hierdoor kan elke dag gedurende één of twee weken nieuw medicijn toegevoegd worden, wat dichterbij de realiteit (immers: patiënten nemen elke dag een medicijn gedurende langere periodes). Dit verhoogt de voorspelling van medicijnen. Daarom concluderen we in dit hoofdstuk dat 3D kweek een beter, maar meer geavanceerd, model is voor de voorspelling van medicijn geïnduceerde leverschade. Zoals beschreven is niet alleen belangrijk dat er meer onderzoek wordt gedaan naar de voorspelling van medicijn geïnduceerde leverschade, maar ook naar het mechanisme waarom de medicijnen leverschade veroorzaken. De activatie van stress responsen staat niet op zichzelf. Verschillende stress responsen kunnen elkaar ook aanschakelen, zogehete crosstalk. Voor de crosstalk tussen de oxidatieve stress en de DNA schade responsen is geen consensus in de literatuur. In **hoofdstuk 5** hebben we daarom in een brede concentratie reeks gekeken naar de activatie van beide responsen op referentie stoffen diethyl maleate (oxidatieve stress) en etoposide (DNA schade). Beide stoffen activeren in hoge concentraties ook de andere stress respons, wat crosstalk impliceert. Verder zien we een activatie van DNA schade eiwit p21 als we oxidatieve stress induceren via het uitschakelen van de negatieve regulator (keap1). We besluiten met het uitschakelen van andere (combinaties van) eiwitten om erachter te komen of de activatie van p21 een direct of indirect effect is van keap1.

In alle voorgaande hoofdstukken zien we dat de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons een belangrijke respons is. Om het genetische aspect van het mechanisme van leverschade te onderzoeken, moeten alle factoren die daarvoor van belang zijn in kaart worden gebracht. Voor de Nrf2 respons hebben wij dit gedaan door meer dan 3000 genen individueel uit te schakelen en te kijken naar het effect op Nrf2 respons activatie door te kijken naar Srxn1. We kunnen 58 genen vinden die ervoor zorgen dat Nrf2 geactiveerd wordt als deze uitgeschakeld worden; kortom 58 onderdrukkers van Nrf2. Verder vinden we 19 genen die zorgen voor een verlaagde respons als deze uitgeschakeld zijn; kortom 19 activatoren van Nrf2. We laten zien dat deze genen niet stof specifiek zijn en hetzelfde laten zien bij toevoegen van medicijnen die leverschade veroorzaken. Daarnaast laten we het effect van het uitschakelen van de genen zien op andere componenten van de Nrf2 cascade: Keap1 (negatieve regulator), Nrf2 (transcriptie factor), Nqo1 en Hmox1 (targets van Nrf2, net als Srxn1). Als laatste laten we zien dat dit genen zijn die relevant zijn in leverschade: de genen die Nrf2 activeren werken beschermend. Daarom concluderen wij dat het minder bezitten van deze genen een genetische reden kan zijn voor het gevoelig zijn voor leverschade.

Kortom: in dit proefschrift hebben we gekeken naar een manier om medicijn geïnduceerde leverschade beter te voorspellen en of we meer mechanistisch inzicht konden krijgen in hoe de medicijnen leverschade veroorzaken. Door fluorescent gelabelde stress respons eiwitten te volgen onder de microscoop hebben we gezien dat in leverschade vaker stress responsen geactiveerd zijn. Dit zou dus een goed systeem zijn om toe te voegen aan de reeks van testen die uitgevoerd worden voor een medicijn de markt op kan.