



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Dynamics and regulation of the oxidative stress response upon chemical exposure

Bischoff, L.J.M.

Citation

Bischoff, L. J. M. (2022, January 12). *Dynamics and regulation of the oxidative stress response upon chemical exposure*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3249612>

Version: 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/1887/3249612>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Er is een toenemend aantal chemische stoffen in de samenleving, waaronder geneesmiddelen, milieugevaarlijke stoffen en cosmetica, samen ook wel aangeduid als het “chemisch exposoom”. Evenzo is er een verhoogd gevaar voor chemisch geïnduceerde gezondheidseffecten. Chemische stoffen kunnen interfereren met biologische systemen en stof specifieke reacties induceren gerelateerd aan de farmacologische on- of off-target-effecten. In het bijzonder chemische stoffen met een (in)directe elektrofiële reactiviteit zijn rechtstreeks schadelijk voor cellen. Dergelijke chemische stoffen interfereren met normale cellulaire fysiologische processen en zorgen voor activatie van adaptieve cellulaire stressreacties die de cellulaire schade trachten te herstellen. Inzicht in de fundamentele relatie tussen activering van deze cellulaire stressreacties en het uiteindelijke ontstaan van cytotoxiciteit kan worden gebruikt voor het construeren van mechanistische biomarkers.

In deze studie hebben we ons gericht op de adaptieve respons die een rol speelt bij de bescherming tegen chemische stoffen met “zachte” elektrofiële eigenschappen en stoffen die de aanmaak van reactieve zuurstofcomponenten (reactive oxygen species (ROS)) bevorderen, de oxidatieve stress response. De oxidatieve stress respons staat ook bekend als de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons genoemd naar zijn transcriptiefactor, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Onlangs werd duidelijk dat naast genen en eiwitten, microRNA, een type kort, niet coderend RNA, een belangrijke rol speelt bij de regulering van stress responsen.

Blootstelling aan een chemische stof kan leiden tot verstoring in de regulatie van microRNA's.

Om meer inzicht te krijgen in het de verschillen in expressie van microRNA, in verschillende biologische matrices, na chemische blootstelling werd een literatuurstudie uitgevoerd. De resultaten van deze studie worden gepresenteerd in **Hoofdstuk 2**. We ontdekten dat de microRNA's die het meest frequent ontregeld bleken te zijn, ook een rol bleken te spelen bij verschillende ziekten die verband houden met blootstelling aan chemische stoffen. Hoewel veranderingen in de expressie van microRNA's een groot potentieel hebben om als biomarker gebruikt te worden, blijven er vragen bestaan over de robuustheid van microRNA als biomarker, de biologische functionaliteit en de causaliteit van de respons. Het blijft onduidelijk of microRNA's die in het bloed, of eventueel een ander lichaamsvocht, kunnen worden gedetecteerd gebruikt kunnen worden als een mechanistische biomarker die informatie verschaffen over het werkingsmechanisme achter de toxiciteit van een bepaalde chemische stof. Tot dusver zijn in het bloed gemeten biomarkers

nog niet eenduidig te linken aan hun werkingsmechanisme. Het is nog steeds onduidelijk of de verandering in expressie van bepaalde microRNA's gemeten in het bloed, inderdaad een functionele rol heeft, dan wel of de verandering in expressie gewoon het gevolg is van weefselschade. MicroRNA's waarvan bekend is dat zij sterk gerelateerd zijn aan een specifiek orgaan, zoals miR-122 voor de lever, kunnen in ieder geval waardevolle informatie verschaffen over welk orgaan beschadigd is bij blootstelling aan een chemische stof of tijdens ziekte.

Het is ingewikkeld om te bepalen of kandidaat-microRNA biomarkers een functionele rol spelen in het ziektemechanisme. Eén enkele microRNA kan honderden verschillende targets hebben waardoor de rol van een microRNA in verschillende weefsels verschillend kan zijn. Een microRNA kan de stressrespons zowel versterken, als het onderdeel is van een positieve feedback loop, als verzwakken. Dit laatste gebeurt als de microRNA betrokken is bij de remming van negatieve regulatoren (negatieve feedback loop).

Het is nog steeds een uitdaging om microRNA goed te meten. Nieuwe meettechnieken, zoals droplet digital PCR en nieuwe strategieën om samples te verkrijgen, zoals het kunnen scheiden van microRNA bevattende extracellulaire vesicles, maken vervolg stappen op het gebied van microRNA onderzoek mogelijk. Om de rol van microRNA's in de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons te onderzoeken, hebben we gekeken naar het effect van van ~2600 individuele microRNA mimics op de activatie van GFP-gelabeld Srxn1, een Nrf2 target, na blootstelling aan de electrofiële stof CDDO-Me. In dit onderzoek, gepresenteerd in **Hoofdstuk 3**, identificeerden we een panel van 16 microRNA's die de CDDO-Me-geïnduceerde Srxn1-GFP expressie versterken (waaronder miR-3165, miR-1909-3p, miR-1293, en miR-6499-3p) en 10 microRNA's die de CDDO-Me-geïnduceerde Srxn1-GFP expressie remmen (waaronder miR-200a-3p, miR-363-3p, miR-502-5p, en miR-25-3p). Deze microRNA's zouden relevante biomarkers kunnen zijn en/of alternatieve therapeutische targets kunnen bieden om de activiteit van de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons in gezondheid (preventief) en ziekte te moduleren. Concluderend, deze studie laat voor het eerst het geheel aan microRNA's zien die de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons als target hebben.

De microRNA's die volgens onze studie de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons versterken of remmen, zouden gebruikt kunnen worden als microRNA therapeutica die zich richten op de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons. Verhoogde activering van de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons wordt beschouwd als een pro-oncogene respons. Daarom, om informatie te verkrijgen

over de primaire respons op microRNA expressie veranderingen, is er behoefte aan verdere temporele analyse van de transcriptionele veranderingen na microRNA transfectie. MicroRNA's die in staat zijn de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons te remmen, kunnen worden gebruikt om kankercellen kwetsbaarder te maken voor chemo- en radiotherapie. MicroRNA's die de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons versterken, zouden gebruikt kunnen worden om de bescherming tegen oxidatieve stress te ondersteunen. Aanvullend onderzoek is nodig om inzicht te krijgen in de dosis-respons relatie van onze kandidaat Nrf2 modulerende microRNA's en hoe veilig (lange termijn) gebruik van microRNA is als therapie. Voorzichtigheid is echter geboden om microRNA's die de Nrf2 respons veranderen als direct target van Nrf2 te bestempelen. MicroRNA's kunnen de Nrf2 route namelijk op verschillende manieren reguleren: 1) door de nucleaire translocatie van Nrf2 te beïnvloeden, en 2) door de expressie van Nrf2 te beïnvloeden door de upstream mediators van Nrf2 te reguleren en middels de modulatie van *KEAP1*. Verder kan ook redox stress op zichzelf de aanmaak van microRNA's beïnvloeden, wat bijvoorbeeld kan leiden tot veranderde redox signalering en ziekte mechanismen.

In het dagelijks leven vindt niet alleen eenmalige blootstelling aan een chemische stof plaats, maar wordt je ook herhaaldelijk blootgesteld aan chemische stoffen. Desondanks is onze kennis betreffende de dynamiek van de oxidatieve stress respons bij herhaalde blootstelling klein. Om deze dynamiek bij herhaalde blootstelling te bestuderen, gebruikten we confociaal microscopie in combinatie met HepG2-GFP reporter cellen. Deze cellen werden herhaaldelijk blootgesteld aan verschillende concentraties diethylmaleaat (DEM) en tert-butylhydroquinone (tBHQ). Het resultaat van deze studie wordt beschreven in **Hoofdstuk 4**. Interessant is de bevinding dat na een tweede behandeling na 24 uur er minder Nrf2 in de kern werd gemeten dan na de eerste blootstelling met dezelfde concentratie. Dit geeft aan dat de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons adaptief is. Echter, de hoeveelheid Srxn1 in de cel was driemaal zo hoog in vergelijking met de eerste behandeling. Hoewel meer onderzoek nodig is om het precieze mechanisme te ontrafelen, is het duidelijk dat herhaalde blootstellingstesten waardevolle extra informatie kunnen verschaffen bij het beoordelen van de veiligheid van een chemische stof of geneesmiddel. Bovendien zou, zoals uit verschillende studies blijkt, preconditionering kunnen worden gebruikt voor therapeutische benaderingen waarbij lage niet-toxische concentraties van een chemische stof die de oxidatieve stress respons activeert kan worden gebruikt om bescherming op te bouwen tegen een toxische concentratie. Het blijft echter een uitdaging om het optimale doseringsschema te vinden: dosis per behandeling, tijd tussen de behandelingen en aantal herhaalde behandelingen.

Aangezien activering van de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons bij chemische blootstelling zou kunnen wijzen op oxidatieve schade, formuleerde we de hypothese dat het vermogen van chemische stoffen om oxidatieve stress te veroorzaken en een Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons te stimuleren kan worden afgeleid aan de hand van de temporele dynamiek van stress respons eiwitten gecombineerd met transcriptoom expressie profielen.

Om deze hypothese te testen werd een panel van verschillende fenolen gebruikt: redox cyclische fenolen, gealkyleerde fenolen, of niet-redox cyclische fenolen. De resultaten van deze studie worden beschreven in **Hoofdstuk 5**. We integreerden high throughput transcriptomics met behulp van gerichte RNA sequencing van primaire menselijke hepatocyten (PHH) en HepG2 Nrf2-GFP en Srxn1-GFP reporter cellijnen. Gebruikmakend van een panel van vijf pro-oxidanten, waaronder CDDO-Me, sulforafaan, tert-butyhydroperoxide, etacrynic acid en diethylmaleaat, identificeerden we een panel van vijf Nrf2 target genen die het oxidatieve stresspotentieel zouden kunnen bepalen: *AKR1B10*, *SRXN1*, *ABCC2*, *AKR1C3* en *NQO1*. Vervolgens werd de response van deze vijf genen gemeten na blootstelling aan verschillende concentraties van de drie typen fenolen.

Onze bevinding was dat het meten van deze vijf genen gebruikt kon worden om de drie gedefinieerde typen fenolen van elkaar te onderscheiden. We laten hier ook mee zien dat integratie van high throughput HepG2 gemedieerde oxidatieve stress respons reporter cellijn data met transcriptomics data van HepG2 en PHH cellen, waardevolle mechanistische informatie oplevert over het werkingsmechanisme van structureel verwante fenolen.

Samenvattend, het onderzoek beschreven in dit proefschrift levert aanvullende informatie over de dynamiek van de Nrf2 gemedieerde oxidatieve stress respons bij eenmalige en herhaalde blootstelling en het mogelijke gebruik van belangrijke spelers in deze stress respons als onderdeel van een panel van mechanistische biomarkers voor chemische blootstelling en ziekte. Vooral microRNA's zouden van toegevoegde waarde kunnen zijn in deze biomarkerpanels. Bovendien kan door het vergaren van meer inzicht over de rol van microRNA's in stress responsen het precieze werkingsmechanisme van deze stress responsen worden ontrafeld.