



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mitochondria in chemical-induced toxicity

Stel, W. van der

Citation

Stel, W. van der. (2022, February 1). *Mitochondria in chemical-induced toxicity*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3270836>

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/1887/3270836>

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

Nederlandse Samenvatting

Een ongewenst effect van blootstelling aan chemische substanties zoals medicijnen, pesticiden, industriële grondstoffen en cosmetica, is het ontstaan van schade aan cruciale organen. In veel gevallen is deze schade terug te leiden tot de verstoring van verschillende organellen in de cel. Een van de belangrijkste organellen van de cel zijn de mitochondriën. De meeste cellen in het menselijk lichaam zijn in het bezit van honderden mitochondriën, die samen verantwoordelijk zijn voor de productie van energie, opslag en constructie van bouwstoffen en de regulatie van celdood. Verstoring van deze processen door langdurige lage of acute hoge blootstelling aan chemicaliën leidt tot celdood, weefsel schade en uiteindelijk orgaanletsel. In de laatste jaren heeft de industrie verschillende studies geïntroduceerd om orgaanletsel te voorkomen door vroegtijdig nieuwe substanties die mitochondriële schade veroorzaken op te sporen. Om deze vroegtijdige risico analyse te verbeteren is het van groot belang om de relatie tussen mitochondriële schade en de uiteindelijke uitkomst voor mensen en dier beter te begrijpen. Deze kennis draagt bij aan de verbetering en hervorming van de mitochondriële risicobeoordeling voor zowel bestaande als nieuwe chemische substanties.

Mitochondriën zijn opgebouwd uit een dubbel membraan welke een geladen compartiment omsluit. Daarnaast bezitten mitochondriën verschillende enzymen die betrokken zijn bij de omzetting van xenobiotica naar metabolieten. Al deze factoren maken dat chemische substanties, zowel de oorspronkelijke stof als de metabolieten, sneller ophopen in mitochondriën dan in andere cel organellen. Schade aan een fractie van de mitochondriën zal niet onmiddellijk leiden tot ernstige weefsel- of orgaan schade sinds de mate van cellulaire toxiciteit vooral afhangt van de hoeveelheid beschadigde mitochondriën per cel en de snelheid waarmee de totale populatie van mitochondriën kan herstellen. De cel en zijn mitochondriën bezitten verschillende adaptieve stress responses die de cel mogelijkheden biedt om te herstellen. De beschikbare responsen zijn onder anderen mechanismen die de hoeveelheid reactieve elementen verminderen of beschadigde eiwitten kunnen herstellen. Daarnaast kunnen mitochondriën hun morfologie veranderen: door het fuseren van individuele organellen of fragmentere van 1 organel in meerderen, kan DNA en eiwitten worden uitgewisseld of beschadigde delen worden afgesplitst zodat deze delen specifiek kunnen worden afgebroken. Al deze systemen maken dat de cel een beperkte hoeveelheid stress intern kan afhandelen. Als de hoeveelheid stress en daarmee dus schade te groot wordt, dan zal de cel celdood programma's activeren om daarmee het weefsel of het orgaan in zijn geheel te kunnen beschermen. Echter, langdurig geringe of acute schade kunnen beiden leiden tot grote hoeveelheden celdood en daarmee uiteindelijk ook toch tot orgaan schade.

Sommige organen zijn gevoeliger voor het ontwikkelen van mitochondrieel gerelateerde problemen dan andere. Dit zijn organen die veel energie nodig hebben voor het uitvoeren van hun functie, zoals hart, de nieren en spieren, maar ook weefsels die volledig afhankelijk zijn van mitochondriën voor de energie productie, zoals neuronen. Tot slot zijn de organen die betrokken zijn bij het verwerken van alle opgenomen stoffen, zoals de nieren en de lever, ook extra gevoelig vanwege de verhoogde blootstelling aan chemische stoffen en hun metabolieten.

In dit proefschrift bestuderen wij de rol van mitochondriën in de ontwikkeling van cellulaire schade na blootstelling aan chemische substantie, in het bijzonder landbouwchemicaliën. Hierbij hebben wij met verschillende technieken het functioneren van de mitochondriën en de cel in kaart gebracht, om vervolgens deze informatie te kunnen gebruiken in de risico beoordeling van chemische substanties.

In **hoofdstuk 2** hebben we de zes meest belangrijke mitochondriële processen, die verstoord kunnen raken in mitochondriën gerelateerd letsel, gedefinieerd aan de hand van de ontwikkeling van menselijke ziekten veroorzaakt door mutaties in eiwitten betrokken bij deze processen. We bespreken de huidige *in vitro* methoden om deze processen te bestuderen. Tot slot bespreken we de mogelijkheid om deze methoden te gebruiken in verschillende cel modellen in de context van adverse outcome pathways (AOP) om zo kennis te genereren die bruikbaar voor de risicobeoordeling van bestaande en nieuwe chemische substanties.

In **hoofdstuk 3** hebben we meerdere landbouwchemicaliën, die zijn ontworpen om specifiek de mitochondriële energie productie te verstoren in ongedierte, getest op hun versturende werking in human mitochondriën. Voor deze vergelijkingsstudie hebben we gekozen voor 2 humane cel types die gerelateerd zijn aan organen met verhoogde gevoeligheid voor: HepG2 als lever-achtig celtype en RPTEC-TERT1 als nier-achtig celtype. Wij hebben hier de verstoring van mitochondriën bestudeerd door gebruik te maken van een set bekende mitochondriële remmers in meerdere assays die momenteel beschikbaar zijn voor het visualiseren en bestuderen van mitochondriën.

De remmers verstoren mitochondriële energie productie door een interactie aan te gaan met 1 van de 5 betrokken eiwitcomplexen. Gebruikmakend van de geselecteerde assays hebben wij duidelijk het verschil in potentie tussen de remmers van eiwitcomplex I en III laten zien. Daarnaast werd het duidelijk dat het meten van de mitochondriële ademhaling de meest gevoelige waarneming is in beide celtypes. De blootstelling aan complex II remmers heeft geen gevolgen in deze celtypes. Het aanpassen van de kweek-condities door middel van het vervangen van het medium of de introductie van een artificiële extracellulaire matrix leidde tot verhoogde

sensitiviteit van de HepG2 cellen, voornamelijk bij blootstelling aan mitochondriële complex I remmers.

In **hoofdstuk 4** hebben wij ons specifiek gericht op mechanistisch onderzoek om de interactie tussen mitochondriën en de cell ten tijde van mitochondriële schade te ontrafelen. De chemicaliën als beschreven in hoofdstuk 3 zijn ingezet in een combinatie van microscopie- en genexpressie assays voor zowel mitochondriële als cellulaire metingen. Met deze opzet was het mogelijk om de effecten van chemicaliën op mitochondriële integriteit en cellulaire gezondheid te koppelen aan veranderingen in gen expressie. Aan de hand van verschillende gen expressie analysis waren wij niet in staat om complex I- of complex III-specifieke genexpressie patronen of unieke genen te identificeren. Het was wel mogelijk om een set genen te selecteren die uniek was voor de verstoring van mitochondriën in het algemeen. Het genexpressie profiel komt overeen met de waarnemingen van de membraan integriteits metingen en mitochondriële ademhaling. Daarnaast hebben we onderzocht of deze set van genen in staat was om mitochondriële verstoring te detecteren in een nieuwe set chemicaliën, waarvan bekend is dat zij leverschade veroorzaken. De set van genen voorspelde correct de correlatie tussen de mitochondriële membraan integriteit en gen expressie voor 4 van de 5 geteste chemicaliën. Tot slot konden we vaststellen dat het uitschakelen van enkele van deze genen leidde tot meer celdood, nadat mitochondriële schade was opgetreden.

Eerder hebben we aangegeven dat het belangrijk is om de betrokkenheid van mitochondriën in cellulaire schade te kunnen visualiseren en dit het liefst te kunnen doen in een vroeg stadium van de risico beoordeling. In **hoofdstuk 5** hebben we de potentie van mitochondriële morfologie als mogelijke indicator voor mitochondriële schade bekeken. Daarnaast hebben we de relatie tussen mitochondriële morfologie en andere mitochondriële metingen zoals het ATP niveau, het mitochondriële membraan potentiaal (MMP) en de levensvatbaarheid bestudeerd. Ten eerste hebben we een analyse methode opgezet om objectief grote hoeveelheden microscopie data te analyseren en de aanwezige mitochondriën te classificeren als gefuseerd of gefragmenteerd. Deze analyse methode kon worden gebruikt om de waargenomen morfologie te kwantificeren. Het blijkt dat gefragmenteerd mitochondriën vooral ontstaan na blootstelling aan complex V en niet aan complex I of III remmers welke allen leiden tot een afname in het ATP niveau, maar een verschillend effect hebben op MMP. Het verschil in morfologische verandering kon worden relateerd aan het optreden van specifieke veranderingen in een eiwit, namelijk OPA1. Tot slot hebben we gekeken naar de relatie van meerdere eiwitten die betrokken zijn bij de morfologische veranderingen en verschillende mitochondriële meting zoals het ATP niveau, MMP en levensvatbaarheid na blootstelling aan oligomycin.

In het laatste experimentele **hoofdstuk 6**, hebben we de effecten van mitochondriële ademhaling remmers op de MM- dynamiek bestudeerd aan de hand van computationele modellen. Door gebruik te maken van concentratie- en tijdsafhankelijk data konden we de afname in MMP na blootstelling met complex I-, II- en III-remmers moduleren. Gebaseerd op de geobserveerde afwijking tussen the model en de experimentele data na blootstelling met een uncoupler (FCCP) en een complex V remmer (oligomycin) konden we het model verbeteren door de toevoeging van proton lekkage en farmacokinetiek.

In **hoofdstuk 7** hebben we de verkregen *in vitro* en *in silico* data opgenomen in een risico beoordeling die zich specifiek focust op de vergelijking van chemische substanties met vergelijkbare chemische en biologische eigenschappen. In deze risico beoordeling is alle beschikbare data gekoppeld aan biologische gebeurtenissen die zijn omschreven in een bestaand of een nieuw voorgestelde adverse outcome pathway (AOP). Een AOP is een lineaire beschrijving van een toxicologisch proces aan de hand van opeenvolgende gebeurtenissen, beginnend bij de interactie van een chemische stof met het biologische systeem tot uiteindelijk de ontwikkeling van orgaanschade. We bespreken in dit hoofdstuk twee pesticiden en beredeneren aan de hand van *in vitro* en *in silico* data de waarschijnlijkheid dat zij een risico vormen voor het ontwikkelen van neuronale schade door middel van verstoring van de mitochondriën.

Dit proefschrift vergroot de kennis omtrent de bijdragen van mitochondriën en mitochondriële communicatie in de ontwikkeling orgaanschade. Verder hebben wij verschillende methoden voor de beoordeling van mitochondriën geëvalueerd en in de context geplaatst van risicobeoordeling van chemische substanties. We zijn gestart met het ontwikkelen van high-content methoden om in de toekomst mogelijk sneller en betrouwbaarder mitochondriële verstoring te detecteren en de risico beoordeling uit te voeren aan de hand van biologisch en mechanistisch relevant bewijs.