



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Integrating cellular and tissue dynamics with cell fate decisions through computational modeling

Heldring, M.M.

Citation

Heldring, M. M. (2023, December 12). *Integrating cellular and tissue dynamics with cell fate decisions through computational modeling*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3666239>

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/1887/3666239>

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

Nederlandse Samenvatting

Dierproeven blijven een noodzakelijke stap tijdens preklinische onderzoek naar de veiligheid van geneesmiddelen, maar alternatieve benaderingen die het gebruik van dieren vervangen en daardoor verminderen winnen terrein. Experimentele *in vitro* methoden met cellijnen afkomstig uit menselijk weefsel kunnen worden gebruikt om het effect van chemicaliën op individuele levende cellen te monitoren. Onder normale omstandigheden bevinden cellen zich in homeostase en brengen ze eiwitten tot expressie op een basaal niveau. Bij blootstelling aan cytotoxische chemicaliën leiden verschillende soorten schade tot de activering van stressrespons netwerken, zoals de DNA-schaderespons (DDR), oxidatieve stressrespons (OSR) en 'ongevouwen eiwit' respons (UPR). Deze netwerken spelen een rol in verschillende processen die de hoeveelheid cellulaire schade beperken, cellen helpen herstellen of onomkeerbare celuitkomsten reguleren, zoals senescentie en apoptose. Kleine hoeveelheden schade zijn meestal overkomelijk, maar vereisen activatie van een specifieke set eiwitten die de schade verhelpt. Bovendien hebben cellen tijd nodig om te herstellen, waardoor verdere schade in dochtercellen wordt voorkomen. Dit benadrukt het belang van adequate regulering van de celcyclus, die afhankelijk is van stress- en schadeniveaus.

Door middel van celmicroscopie kunnen bovengenoemde processen over de tijd in individuele levende cellen worden gevolgd. Menselijke cellijnen zijn zeer goed bruikbaar voor onderzoek in combinatie met 'live' microscopie, omdat ze zich onbeperkt kunnen vermenigvuldigen en zodanig kunnen worden gemanipuleerd dat de hoeveelheid intracellulair eiwit zichtbaar wordt onder de microscoop. Dit maakt het mogelijk om de eiwitdynamiek en de celuitkomsten in verschillende chemische blootstellingsscenario's te monitoren. Een dergelijke experimenteel verkregen karakterisering van cellulaire processen bij chemische blootstelling is echter voornamelijk kwalitatief. Daarentegen kunnen kwantitatieve, *in silico* beschrijvingen van de waargenomen eiwitdynamiek en

hun rol bij het ontstaan van toxische cellulaire reacties helpen om de mechanismen die hieraan ten grondslag liggen bloot te leggen en kunnen ze worden gebruikt om voorspellingen te genereren voor vergelijkbare typen schade. Bovendien kunnen processen die plaatsvinden op verschillende biologische organisatieniveaus worden gekoppeld in één kwantitatief raamwerk met behulp van wiskundige modellen die biochemische reacties en celuitkomsten beschrijven. Computationale benaderingen zijn complementair aan experimentele methoden, omdat ze een vereenvoudigd maar toch gedetailleerd begrip van complexe biologische systemen kunnen bieden.

De netwerken die celuitkomsten zoals de voortgang van de celcyclus, senescentie en apoptose reguleren, zijn uitgebreid bestudeerd en er zijn veel eiwitten geïdentificeerd die een cruciale rol spelen in deze processen. In dit proefschrift gebruiken we experimentele gegevens en actuele kennis over activatie van stress-signaleringscascades en celuitkomsten om verschillende soorten computermodellen te creëren. Met deze modellen beschrijven we intracellulaire eiwitsignaleringscascades die worden geactiveerd bij blootstelling aan verscheidene chemische stoffen en hun link met celuitkomst op een wiskundig manier. Op deze manier integreren we biologische processen op moleculair niveau met fenomenen op celniveau zoals celcyclus progressie, senescentie en necrose, en genereren we nieuwe hypothesen over de mechanismen die ten grondslag liggen aan negatieve effecten.

Als eerste stap creëren we een model op basis van differentiaalvergelijkingen (ODE-modellen) voor de reactie op DNA-schade na blootstelling aan cisplatine (een veelgebruikte chemotherapie die DNA-schade veroorzaakt) in de hepatocellulaire carcinoomcellijn HepG2 om het effect van genotoxiciteit op intracellulaire eiwitdynamiek te beschrijven (**Hoofdstuk 2**). We modelleren de activering van het centrale eiwit in de DDR, de transcriptiefactor p53, en drie van de p53-gereguleerde eiwitten MDM2, p21 en BTG2. Dit model is gekalibreerd op gegevens afkomstig van HepG2-cellen die andere expressieniveaus hebben van enzymen en transporter eiwitten dan normale hepatocyten, en zich anders gedragen dan cellen in menselijk leverweefsel. Er zijn echter geen gegevens van even hoge kwaliteit beschikbaar voor cellen in gezond leverweefsel, dus de toepasbaarheid van dit model voor normale levercellen is onbekend. Daarom onderzoeken we of dit model, dat op HepG2 cellen is gebaseerd, kan worden gebruikt om de activatie van stressnetwerken te voorspellen in primaire menselijke hepatocyten (PHH's), dat wil zeggen, cellen die afkomstig zijn van gezond leverweefsel. We gebruiken mRNA-transcriptiegegevens van de genen die coderen voor p53, MDM2, p21 en BTG2, oftewel respectievelijk *TP53*, *MDM2*, *CDKN1A* en *BTG2*, in 50 PHH-donormonsters om de correlatie tussen de expressie van *TP53* en de drie p53-gereguleerde genen te bepalen. Daarnaast gebruiken we ons wiskundige model om 50 monsters van virtuele donoren te maken en de gencorrelaties die op modellen gebaseerd zijn te vergelijken met de gencorrelaties die in PHH's

worden gevonden. Ons model voorspelt even lage positieve correlaties tussen *TP53* en *CDKN1A*, en *TP53* en *BTG2* zoals waargenomen in PHH's, maar kan de enigszins negatieve correlatie tussen *TP53* en *MDM2* in PHH's niet reproduceren. Met deze studie laten we zien dat de p53-p21- en p53-BTG2-relatie in PHH's goed wordt verklaard door HepG2-cellen. De negatieve relatie tussen *TP53*- en *MDM2*-expressie zijn ofwel te verklaren doordat de p53-MDM2-relatie in HepG2-cellen afwijkt van die in PHH's, ofwel doordat essentiële interacties in ons model ontbreken.

Ondanks de incongruentie tussen ons model en PHH's met betrekking tot de p53-MDM2 relatie, is de beschrijving van de dynamiek van eiwitexpressie in HepG2-cellen zeer nauwkeurig. Daarom gebruiken we hetzelfde model als basis om het verband tussen eiwitexpressie en het onderbreken van de celcyclus te bestuderen (**Hoofdstuk 3**). Voor dit doel creëren we een elementair celcyclusprogressie model dat het aantal cellen in de verschillende fases van de celcyclus in de loop van de tijd simuleert. Met dit model onderzoeken we de rol van celcyclusregulatoren p21 en BTG2 tijdens de G2-celcyclusonderbreking die optreedt bij blootstelling aan de chemotherapeutica cisplatine en etoposide. We ontdekken dat BTG2-expressie voldoende is om de G2-onderbreking te verklaren die door cisplatine is geïnduceerd, maar niet die door etoposide. Een model met celcycluscontinuering van G2-fase naar G1 zonder mitose in combinatie met veranderde overgangssnelheden tussen de fases van de celcyclus kan de etoposidegegevens wel verklaren. Bovendien blijkt voortzetting van de celcyclus na de tijdelijke G2-onderbreking niet gerelateerd aan p21- en BTG2-expressie, omdat de expressie van deze eiwitten hoog blijft. Concluderend laten we zien dat enkel de expressiedynamiek van p21 of BTG2 onvoldoende is om de volledige complexiteit rondom het onderbreken en hervatten van de celcyclus te voorspellen. Dit benadrukt de noodzaak van modeluitbreidingen om de dynamiek van tijdelijke onderbrekingen van de celcyclus te voorspellen.

In tegenstelling tot middelen die DNA-schade en daarmee doorgaans een onderbreking van de celcyclus veroorzaken, moduleren hormoonontregelende chemicaliën (EDC's) de voortgang van de celcyclus via stimulatie van deze voortgang. Om de verstoring van hormoonsignalering te onderzoeken, bestuderen we het effect van oestrogeen op de activatie van de oestrogeenreceptor alfa ($ER\alpha$) en de $ER\alpha$ -gereguleerde eiwitten GREB1 en PR, en hun rol tijdens de celcyclus (**Hoofdstuk 4**). We creëren een ODE-model dat de eiwitexpressiedynamiek van $ER\alpha$, GREB1 en PR combineert met de dynamiek van celcyclusprogressie-indicatoren CDK1 en APC/C. Om de nauwkeurigheid van onze modelvoorspellingen te evalueren, bestuderen we de voortgang van de celcyclus in individuele MCF7-borstkankercellen met behulp van microscopie. We ontwikkelen een convolutioneel neurale netwerk voor celsegmentatie en creëren tracks voor individuele cellen om de duur van de verschillende celcyclus fases te kwantificeren. Met ons model simuleren we het effect van GREB1- en PR-inhibitie (knockdowns) op de voortgang van de celcyclus en voorspellen we

met succes de verlengde G1/S-overgangsfase na GREB1-knockdown en de G1-onderbreking na PR-knockdown. Ons model geeft dus mechanistisch inzicht in de regulatie van celcyclusprogressie en vormt een solide basis voor toekomstig onderzoek naar de rol van EDC's in celcyclusprogressie.

Omdat het lot van cellen niet alleen wordt bepaald door intracellulaire dynamiek, maar ook door de micro-omgeving en cel-cel interacties, creëren we een ruimtelijk computermodeel dat de intra- en extracellulaire dynamiek van hepatocyten en immuuncellen in een leverlob na blootstelling aan paracetamol (APAP) simuleert (**Hoofdstuk 5**). In dit model leidt oxidatieve stress en de daaruit voortvloeiende DNA-schade toegebracht door APAP-metaboliet NAPQI tot necrotische celdood en senescentie, waarbij dat laatste effect wordt bepaald door p21-expressie. Omringende immuuncellen dragen vervolgens bij aan de verdere verspreiding van senescentie, maar zijn ook verantwoordelijk voor leverherstel door het vrijkomen van mitogene biomoleculen en het opruimen van senescente cellen. We gebruiken dit model om *in silico* tests uit te voeren om de werkzaamheid van verschillende therapieën en de timing van hun toediening te onderzoeken, met als doel de effecten van APAP-overdosering te neutraliseren. Met dit onderzoek integreren we intra- en extracellulaire invloeden op celuitkomst en creëren zo een realistisch computationeel levermodel dat kan worden gebruikt als basis voor het modelleren van responsen op andere chemische stoffen.

We presenteren in dit proefschrift verschillende computationele modellen om cellulaire reacties op diverse stoffen te simuleren. Tijdens het proces van modelontwikkeling en de toepassing ervan op experimentele gegevens, identificeren we openstaande vragen en genereren we nieuwe hypothesen over het mechanisme achter biologische processen zoals eiwitexpressie en celuitkomst. Daarnaast laten we zien dat modelleren een uitstekend hulpmiddel is om processen op verschillende niveaus van biologische organisatie kwantitatief te integreren. Dit is zeker ook van toepassing op ons doel om intracellulaire eiwitdynamiek in reactie op stress veroorzaakt door chemicaliën en de kwantitatieve relatie met celuitkomst te ontrafelen. Uiteindelijk kunnen dergelijke modellen worden gebruikt in kwantitatieve toxische uitkomstroutes (qAOPs) en daardoor helpen bij het voorspellen van bijwerkingen voor nieuwe chemische stoffen.