

Proteomics investigations : towards mechanisms and biomarkers for drug-induced hepatotoxicity

Citation for published version (APA):

Anke Summeren van, A. (2014). *Proteomics investigations : towards mechanisms and biomarkers for drug-induced hepatotoxicity*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2014

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Nederlandse samenvatting

Een correcte risicoanalyse van nieuwe geneesmiddelen is nog steeds een uitdaging voor de farmaceutische industrie. Het onverwacht optreden van leverbeschadiging tijdens het ontwikkelingsproces is één van de meest voorkomende redenen waarom sommige kandidaat geneesmiddelen niet op de markt gebracht kunnen worden. De lever is vatbaar voor beschadiging omdat het verantwoordelijk is voor de omzetting en verwijdering van giftige stoffen. Vaak wordt deze levertoxiciteit pas opgemerkt in een latere fase van de ontwikkeling van een nieuw geneesmiddel of zelfs pas tijdens klinische studies. Er is daarom nood aan nieuwe screeningsmethoden die deze toxische effecten al in een vroeg stadium van de ontwikkeling kunnen detecteren. Deze nieuwe screeningsmethoden zullen uiteindelijk leiden tot veiligere medicijnen en een efficiëntere ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.

Genomica is de studie van de organisatie en de functies van het genoom van een cel of organisme. Hiervoor wordt de volledige genexpressie geanalyseerd van transcriptie van DNA naar mRNA (transcriptomica) en translatie van mRNA naar een functioneel eiwit (proteomica) tot aan de enzymatische productie van metabolieten (metabolomica).

Het gebruik van genomica om toxicologische processen te bestuderen heet toxicogenomica. Met toxicogenomica kunnen moleculaire mechanismen die gepaard gaan met de toxiciteit van bepaalde stoffen geïdentificeerd worden. De toxicologische eindpunten die gebruikt worden in de toxicogenomica kunnen zowel *in vitro* als *in vivo*, in proefdierstudies, bepaald worden. Daardoor kunnen *in vivo* metingen direct gelinkt worden met *in vitro* bepalingen. Deze vergelijkingen maken het mogelijk om *in vitro* modellen te ontwikkelen die lever toxische geneesmiddelen kunnen identificeren. Naast het identificeren van lever toxische stoffen is het ook belangrijk om deze stoffen te classificeren volgens het type levertoxiciteit dat ze veroorzaken. De meest voorkomende soorten levertoxiciteit zijn: 1) necrose, celdood veroorzaakt door vrije radicalen en toxische metabolieten; 2) steatose, opstapeling van kleine vetdruppels in de lever vaak veroorzaakt door mitochondriële schade waardoor vetzuren niet of slecht worden afgebroken; 3) cholestase; opstapeling van gal in de lever door een slechte werking van de gal transport eiwitten.

Het doel van dit proefschrift is om betrouwbare *in vitro* modellen te ontwikkelen om lever toxische stoffen te identificeren, te classificeren en een inzicht te krijgen in de moleculaire processen die deze stoffen teweegbrengen. Hiervoor werden gekende lever toxische (hepatotoxische) stoffen gebruikt die ofwel necrose, steatose of cholestase induceren. Aan de hand van proteoom analyse, gedeeltelijk verrijkt met transcriptomica data, werden expressieprofielen gegenereerd reflecterend voor de verschillende soorten van lever toxiciteit (necrose, cholestase en steatose).

SAMENVATTING VAN DE STUDIES BESCHREVEN IN DIT PROEFSCHRIFT

Voor het bestuderen van toxicologische processen wordt vaak gebruik gemaakt van HepG2 cellen. HepG2 is een onsterfelijke cellijn die gemaakt werd van humane levercellen afkomstig

uit een hepatocellulair carcinoom. Deze cellen met lever-specifieke eigenschappen kunnen zichzelf oneindig vermenigvuldigen waardoor ze gemakkelijk te kweken zijn. In **Hoofdstuk 2** werden HepG2 cellen bloedgesteld aan de hepatotoxische stoffen acetaminophen (induceert necrose), amiodarone (induceert steatose) en cyclosporine A (induceert cholestase). Daarna werd de eiwitexpressie in deze cellen bestudeerd. Aan de hand van de eiwitexpressie werden de moleculaire processen veroorzaakt door deze hepatotoxische stoffen geanalyseerd. Bovendien is onderzocht of deze hepatotoxische stoffen van elkaar onderscheiden kunnen worden op basis van hun eiwitexpressie profiel. Uit deze studie bleek dat het mogelijk was om cyclosporine A te onderscheiden van de controle en de HepG2 cellen behandeld met acetaminophen en amiodarone. Daarnaast werden er aanwijzingen gevonden dat cyclosporine A een stressreactie veroorzaakt in het endoplasmatisch reticulum (ER). Een stressreactie van het ER kan onder andere veroorzaakt worden door opstapeling van cholesterol in het ER. Het is bekend dat cyclosporine A het transport van galzouten uit de lever naar de galkanalen remt. Galzouten worden gemaakt uit cholesterol, de productie van gal is een van de manieren om de hoeveelheid cholesterol in de lever op peil te houden. Daarom zal cyclosporine A niet alleen zorgen voor een opstapeling van galzouten maar ook voor een stijging van de cholesterol, hetgeen vervolgens een stressreactie in het ER te weeg brengt.

Ondanks dat HepG2 cellen een veelgebruikt *in vitro* model is, hebben deze cellen ook een aantal nadelen. Zo missen ze een aantal lever specifieke enzymen die belangrijk zijn voor het metabolisme en de detoxificatie van toxische stoffen. Deze specifieke enzymen zijn wel aanwezig in primaire levercellen (hepatocyten) geïsoleerd uit humaan leverweefsel. Daarom wordt het gebruik van primaire humane hepatocyten aangeraden voor toxicologische onderzoeken. Echter, geschikt humaan leverweefsel om hepatocyten te isoleren is slechts in beperkte mate verkrijgbaar. Dit probleem kan deels worden opgelost door primaire muizen hepatocyten te gebruiken. In **hoofdstuk 3** analyseerden we de eiwitexpressie van primaire muizen hepatocyten die werden blootgesteld aan acetaminophen, amiodarone of cyclosporine A. Bovendien werden deze resultaten vergeleken met de eiwitexpressie van HepG2 cellen, een *in vitro* model met humane cellen. Ook in primaire muizen hepatocyten kon het effect van cyclosporine A op het proteoom, onderscheiden worden van de controle en de, acetaminophen en amiodarone behandelde cellen. Vergelijkbaar met de HepG2 cellen bracht cyclosporine A ook in primaire muizen hepatocyten een stressreactie van het ER te weeg. Bovendien werden er aanwijzingen gevonden voor een belemmerd eiwittransport van het ER naar het Golgi-apparaat. ER-stress en een belemmerd ER-Golgi transport kan er toe leiden dat bepaalde eiwitten die normaal worden uitgescheiden, niet meer gesecreteerd kunnen worden en dus zullen opstapelen in de cel. Om deze hypothese verder te onderzoeken werd het secretoom (eiwitten uitgescheiden door de cellen) van primaire muizen hepatocyten na behandeling met acetaminophen, amiodarone of cyclosporine A geanalyseerd. Deze studie staat beschreven in **hoofdstuk 4**.

Het secretoom van de hepatocyten is een goede bron van kandidaat biomarkers voor hepatotoxiciteit. Dit komt omdat, naast de detoxificatie van toxische stoffen, de lever ook verantwoordelijk is voor de productie en secretie van verschillende serumeiwitten. Met andere

woorden, wanneer er specifieke eiwit markers voor hepatotoxiciteit worden gevonden in het secretoom van hepatocyten, is de kans groot dat deze markers ook aanwezig kunnen zijn in het bloed of serum van patiënten met levertoxiciteit. Hierdoor zou het mogelijk zijn om hepatotoxiciteit op te sporen bij patiënten, bijvoorbeeld in klinische studies.

Analyse van het secretoom van de primaire muizen hepatocyten toonde aan dat deze cellen een aanzienlijke hoeveelheid plasma-eiwitten uitscheiden, zoals albumine, ceruloplasmine en antitrombine III. Dit geeft aan dat in primaire muizen hepatocyten de lever-specifieke eigenschappen met betrekking tot eiwitsecretie goed bewaard zijn gebleven.

Op basis van de bevindingen uit hoofdstuk 3, veronderstelden we dat cyclosporine A een stressreactie veroorzaakt in het ER, wat een remming van de eiwitsecretie zou veroorzaken. Het secretoom van primaire muizen hepatocyten behandeld met cyclosporine A vertoonde inderdaad een verminderde hoeveelheid van bepaalde eiwitten. Maar cyclosporine A verhoogde ook de secretie van een aantal plasma-eiwitten zoals serumalbumine. Sommige van deze plasmaeiwitten zijn ook verhoogd teruggevonden na blootstelling aan acetaminophen of amiodarone. Meestal gaat leverfalen gepaard met een verminderde hoeveelheid serumalbumine; een verhoogde aanwezigheid van serum eiwitten was dan ook onverwacht. Albumine is het meest voorkomende eiwitmolecuul in het bloed. Het is onder andere verantwoordelijk voor het transport van stoffen in het bloed. Niet alleen lichaamseigen stoffen maar ook lichaamsvreemde stoffen zoals medicijnen en toxicologische verbindingen. Waarschijnlijk is de verhoogde aanwezigheid van albumine in het secretoom van primaire muizen hepatocyten een beschermingsreactie in een vroeg stadium van toxiciteit. In een later stadium bij het optreden van leverfalen is de lever niet meer in staat om voldoende hoeveelheden albumine te produceren, wat zal resulteren in verlaagde hoeveelheid albumine in het bloed. Naast de differentiële expressie van typische plasmaeiwitten, hadden de lever toxische stoffen ook een invloed op het cholesterol- en lipidenmetabolisme. Veranderingen in het cholesterol- en lipidenmetabolisme zijn typisch voor het ziektebeeld van cholestase en steatose. Men zou daarom verwachten dat eiwitten die geassocieerd worden met het cholesterol- en lipidenmetabolisme voornamelijk differentieel tot expressie worden gebracht door steatosis- en/of cholestase-inducerende verbindingen. Toch werden sommige van deze eiwitten ook door acetaminophen veranderd tot expressie gebracht. Dit wijst op een overlap van de moleculaire mechanismen geactiveerd door hepatotoxische stoffen die toch verschillende ziektebeelden tweeebrengen.

In de vorige studies werden HepG2 cellen en primaire muizen hepatocyten geëvalueerd op basis van een beperkte set eiwitten, geïdentificeerd met behulp van differentiële gel elektroforese (DIGE). Dankzij microarrays is het mogelijk om de expressie van duizenden genen te volgen. In **hoofdstuk 5** werd de invloed van acetaminophen, amiodarone en cyclosporine A geanalyseerd op het niveau van genexpressie in HepG2 cellen en primaire muizen hepatocyten. Na de analyse van de genen die verschillend tot expressie werden gebracht door de hepatotoxische stoffen, bleek er een sterke gelijkheid te zijn tussen de toxische respons in

HepG2 cellen en de reactie in primaire muizen hepatocyten. Dit wijst erop dat primaire muizen hepatocyten in staat zijn om toxische reacties in de mens te voorspellen.

In de voorgaande hoofdstukken werden alternatieve *in vitro* modellen (HepG2 en primaire muizen hepatocyten) geëvalueerd op hun vermogen om hepatotoxische stoffen te identificeren. Idealiter geven deze *in vitro* modellen een weerspiegeling van een toxicologische reactie *in vivo*. Daarom is het relevant om *in vitro/in vivo* vergelijkingen uit te voeren. In **hoofdstuk 6** wordt de ontwikkeling van cholestase als gevolg van een dagelijkse dosis cyclosporine A bestudeerd. Hiervoor werd de eiwit expressie in de levers van C57BL/6 muizen na 4, 11 en 25 dagen blootstelling aan cyclosporine A geanalyseerd. Na 25 dagen blootstelling konden typische kenmerken van cholestase waargenomen worden. Om een *in vitro/in vivo* vergelijking mogelijk te maken werd de eiwitexpressie na blootstelling van cyclosporine A aan de HepG2 cellen (hoofdstuk 2) en de primaire muizen hepatocyten (hoofdstuk 3) vergeleken met de eiwitexpressie geïnduceerd *in vivo*. Zowel *in vitro* als *in vivo* werd aangetoond dat cyclosporine A een invloed heeft op het cholesterolmetabolisme, wat mogelijk kan leiden tot een stressreactie van het ER. Terwijl er *in vitro* aanwijzingen werden gevonden voor een stressreactie van het ER, waren deze effecten *in vivo* minder uitgesproken. *In vivo* werden voornamelijk de mitochondriën aangetast door cyclosporine A in plaats van het ER. Deze verschillen geven aan dat *in vitro* modellen verschillend kunnen reageren ten opzichte van de *in vivo* situatie. Mogelijk is dit te verklaren doordat *in vitro* de cellen in direct contact komen met de toxische stoffen. Bovendien functioneren *in vitro* de cellen onafhankelijk van andere cellen en organen. Deze verschillen tussen *in vitro* en *in vivo* modellen kunnen verklaren waarom het zo moeilijk is om *in vitro* biomarkers te valideren ten opzichte van *in vivo* modellen. Ondanks sommige verschillen in de toxicologische respons *in vitro* ten opzichte van *in vivo*, hebben de huidige *in vitro* modellen het potentieel om verschillende types van levertoxiciteit onderscheiden.

Tot nu toe werd voor het bestuderen van necrose, steatose en cholestase gebruik gemaakt van de levertoxische stoffen acetaminophen, amiodarone en cyclosporine A. In **Hoofdstuk 7** wordt nagegaan of chemische stoffen die gelijkaardige toxicologische eindpunten (necrose, steatose of cholestase) veroorzaken, ook gelijkaardige eiwitprofielen laten zien. Hiervoor werden primaire muizen hepatocyten blootgesteld aan zes goed gekarakteriseerde hepatotoxische stoffen: diclofenac en paraquat (induceren necrose), tetracycline en valproic acid (induceren steatose) en chlorpromazine en ethenylestradiol (induceren cholestase). Twee stoffen die toxisch zijn voor de nieren: D-mannitol en LiCO₃ werden gebruikt als negatieve controles. Daarna werd hun eiwitexpressie profiel geanalyseerd. Vervolgens werden deze resultaten gecombineerd met de resultaten uit hoofdstuk 3, waar de primaire muis hepatocyten werden blootgesteld aan acetaminophen, amiodarone en cyclosporine A. Een principale componentenanalyse werd gebruikt om te bepalen of het mogelijk was om de verschillende soorten hepatotoxische stoffen van elkaar te onderscheiden op basis van hun eiwitexpressieprofiel. De necrotiserende verbindingen konden voornamelijk onderscheiden worden van de andere stoffen op basis van de volgende eiwitten: catalase, glutamaat pyruvaat transaminase 2, UDP-glucose pyrophosphorylase 2, arginase 1 en peroxiredoxine 6. Stoffen die cholesta-

se induceren werden voornamelijk onderscheiden op basis van vitamine D verbindend eiwit. Tot slot werden stoffen die steatose veroorzaken voornamelijk onderscheiden op basis van carnitine O-palmitoyltransferase 2. Daarom zijn deze eiwitten goede kandidaten voor klasse-specifieke biomarkers, maar verdere validatie is nodig om hierover uitsluitel te geven.

TEKORTKOMINGEN EN AANBEVELINGEN

Niet alle hepatotoxische stoffen bestudeerd in dit proefschrift, toonden een typisch toxicologisch effect op het proteoom van de geteste *in vitro* modellen. Mogelijk hebben deze *in vitro* modellen een verlaagde expressie van enzymen verantwoordelijk voor het metabolisme en de detoxificatie van toxische stoffen.

Verder wordt de classificeren van hepatoxische stoffen bemoeilijkt door een overlap van sommige fenotypische eigenschappen tussen de verschillende soorten van hepatotoxiciteit. Om verder inzicht te krijgen in de hepatoxische mechanismen is het aanbevolen om transcriptomica, proteomica en metabolomica data met elkaar te vergelijken. In dit proefschrift werd data van proteome analyse gedeeltelijk aangevuld met transcriptome data. Ondanks, de verschillende technieken uit de bio-informatica blijft het moeilijk om proteomica data te vergelijken met transcriptomica data. Met behulp van microarrays is het mogelijk om een bijna volledige set van target genen te analyseren, terwijl dit niet mogelijk is met de standaard technieken uit de proteomica. Proteome analyse met behulp van DIGE is vooral gericht op de detectie van oplosbare eiwitten zonder extreme pI waarden. Deze tekortkomingen kunnen gedeeltelijk worden overkomen door een DIGE analyse te combineren met vloeistofchromatografie gekoppeld met massa spectrometrie. Maar zelfs na het combineren van beide technieken is het aantal differentiële eiwitten die gedetecteerd kunnen worden met proteomics slechts een fractie van de data die met microarrays gegenereerd worden. In een directe vergelijking van proteome en transcriptome data zullen sterk genen die sterk tot uiting komen bevooroordeeld worden. In de toekomst, zal de ontwikkeling van nieuwe software de kracht van high-throughput technologieën uit de proteomica en transcriptomica versterken.

De *in vitro* modellen uit dit proefschrift hebben enkele beperkingen die de extrapolatie van toxicologische effecten *in vitro* naar humane *in vivo* effecten hinderen. Dit komt omdat de *in vitro* modellen uit dit proefschrift gebruik maken van slechts één soort celtype, namelijk hepatocyten. Terwijl in de lever ook nog andere soorten cellen voorkomen zoals Kupffer en stellate cellen. Dit zou kunnen voorkomen worden door gebruik te maken van *in vitro* modellen op basis van lever slices. In deze lever slices wordt de driedimensionale structuur behouden en bovendien bevatten ze de verschillende celtypes die voorkomen in de lever. Deze lever slices hebben echter als nadeel dat ze slechts voor een beperkte tijd in cultuur kunnen worden gehouden en de grote interindividuele variatie. Uiteindelijk zal verder onderzoek zal leiden tot het optimaliseren van de huidige *in vitro* modellen.

CONCLUSIE

Het onderzoek uit dit proefschrift toont aan dat *in vitro* modellen op basis van hepatocyten relevant zijn voor het classificeren van gekende hepatotoxische stoffen. De studies uit dit proefschrift tonen aan dat proteoom analyse van zowel cellulaire als gesecreteerde eiwitten toxicologische mechanismen aan het licht kan brengen.

Een vergelijking van de gen- en eiwitexpressie profielen, geïnduceerd door hepatotoxische stoffen in HepG2 toonde sterke overeenkomsten met de toxicologische reacties in primaire muizen hepatocyten.

Een *in vitro/in vivo* vergelijking van de eiwit expressie geïnduceerd door cyclosporine A, toonde overeenkomsten in ATP-binding, en cholesterol en koolhydraat metabolisme. Ondanks deze overeenkomstige reacties, werden er ook verschillen gevonden tussen de *in vitro* en de *in vivo* response. Zo werden *in vivo* voornamelijk de mitochondriën aangetast, terwijl *in vitro* voornamelijk het ER werd aangevallen. Deze verschillen in toxicologische reacties tussen *in vivo* en *in vitro* modellen kunnen de validatie van *in vitro* biomarkers in *in vivo* modellen bemoeilijken.

Desondanks werd aangetoond dat de huidige *in vitro* modellen het potentieel hebben om hepatotoxische stoffen te identificeren en ze in te delen volgens het type hepatotoxiciteit dat ze veroorzaken. Daarmee vormt dit onderzoek een basis voor de verdere ontwikkeling van *in vitro* modellen om hepatotoxische stoffen te identificeren en te classificeren met behulp van toxicogenomica.