

VU Research Portal

Yeast as a model eukaryote in drug safety studies

van Leeuwen, J.S.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van Leeuwen, J. S. (2011). *Yeast as a model eukaryote in drug safety studies: New insights on diclofenac-induced toxicity*.

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 ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

VII

NEDERLANDSE SAMENVATTING

GIST ALS MODEL EUKARYOOT IN ONDERZOEK NAAR DE VEILIGHEID VAN MEDICIJNEN: NIEUWE INZICHTEN IN DE TOXICITEIT VAN DICLOFENAC

De ontwikkeling van veel kandidaat-geneesmiddelen wordt vroegtijdig afgebroken doordat er schadelijke bijwerkingen optreden in proefdieren of tijdens klinische studies. Door de toenemende vraag naar veilige geneesmiddelen aan de ene kant en het terugdringen van proefdiergebruik aan de andere kant zijn er nieuwe testsystemen voor toxiciteit nodig. Bovendien eisen de EU REACH richtlijnen op korte termijn toxiciteitsprofielen van meer dan 30.000 chemicaliën, waarvoor testsystemen nodig zijn die in korte tijd de toxiciteit van een groot aantal stoffen nauwkeurig kunnen voorspellen. Het testen van kandidaat-geneesmiddelen en chemicaliën op genotoxiciteit wordt al veelvuldig toegepast. Echter, toxiciteit kan ook veroorzaakt worden door het binden van het geneesmiddel aan een “off-target” of kan aan metabolisme gerelateerd zijn. Metabolisme of biotransformatie verhoogt de wateroplosbaarheid van lichaamsvreemde stoffen en vergemakkelijkt daardoor de excretie via gal, feces en urine. Metabolisme kan echter ook leiden tot de vorming van reactieve metabolieten die toxiciteit kunnen veroorzaken. Cytochroom P450s (P450s) zijn de belangrijkste enzymen betrokken bij het metabolisme van geneesmiddelen, gevolgd door de fase II enzymen glucuronosyltransferases, sulfotransferases en glutathion S-transferases. Polymorfismen in deze enzymen veroorzaken grote individuele verschillen in geneesmiddelfabrikaat en toxiciteit is mede daardoor moeilijk te voorspellen. Proefdieren vertonen vaak andere absorptie, dispositie, metabolisme en excretie (ADME) profielen dan mensen. En zelfs als het ADME-profiel vergelijkbaar is, kunnen proefdieren in het beste geval een gemiddelde persoon nabootsen. Bovendien is het gebruik van proefdieren te duur en tijdrovend om vroeg in de ontwikkeling van een geneesmiddel te gebruiken. Daarom zijn cellulaire modelsystemen ontwikkeld om toxiciteit te testen.

Bakkersgist (*Saccharomyces cerevisiae*) is een veelgebruikt modelorganisme om eukaryote processen te bestuderen. Voordelen van het gebruik van deze gist zijn de relatief lage kosten, snelle groei en eenvoudige genetische modificatie. Bovendien is van een groot deel van de genen de functie bekend, waardoor gist een gewild model is voor studies die het hele genoom bestuderen. Met behulp van gist kunnen zo eiwitten worden geïdentificeerd die betrokken zijn bij de werking of de toxiciteit van geneesmiddelen. Gist wordt ook veel gebruikt om de genotoxiciteit of xeno-oestrogeniciteit van geneesmiddelen of andere stoffen te onderzoeken. Verschillende humane P450s zijn in gist tot expressie gebracht om aan metabolisme gerelateerde toxiciteit te kunnen onderzoeken.

In **hoofdstuk 1** worden de verschillende cellulaire modelsystemen die gebruikt kunnen worden om toxiciteit gerelateerd aan metabolisme te onderzoeken beschreven. Daarnaast wordt een

overzicht gegeven van de literatuur waarin gist als modelsysteem is gebruikt om biotransformatie en bioactivering te bestuderen. Gangbare cellulaire modelsystemen voor zulk soort onderzoek zijn gebaseerd op levercellen, zoals bijvoorbeeld primaire hepatocyten en de HepG2 cellijn. Een nadeel van deze modellen is de noodzaak om P450-remmers te gebruiken om verschil tussen wel en geen bioactivatie in toxiciteit te kunnen waarnemen, omdat deze remmers ook andere processen die relevant zijn voor toxiciteit, zoals transport en glucuronidering, kunnen beïnvloeden. Ook kunnen de P450-niveaus in deze cellen erg verschillen, snel afnemen of kunnen sommige P450s niet aanwezig zijn. Om de rol van P450s in metabolisme en bioactivatie beter te kunnen bestuderen zijn modelsystemen ontwikkeld, waarin humane P450s in *E. coli*, gist of humane cellen tot expressie zijn gebracht. Zoals hierboven beschreven is een groot voordeel van gist de combinatie van eukaryote eigenschappen met snelle groei, makkelijke hanteerbaarheid en relatief eenvoudige genetische manipulatie. De gisten die heterologe P450s tot expressie brengen zijn vaak gebruikt om mutageniciteit van stoffen te onderzoeken. Vooral aflatoxine B₁ is een veelgebruikte modelstof in deze studies. Daarnaast zijn P450-expresserende gisten gebruikt in combinatie met deletiestammen of voor microarray experimenten om zo meer informatie over het mechanisme achter de toxiciteit te verkrijgen. Bovendien laten enkele groepen zien dat combinatie van P450s met andere metabole enzymen, zoals glutathion S-transferases en epoxide hydrolases, nuttig kan zijn in toxiciteit studies.

Zoals hierboven beschreven zijn gisten die heterologe P450s tot expressie brengen vooral gebruikt om genotoxiciteit te bestuderen. In dit proefschrift hebben we het gebruik van gist om niet-genotoxische toxiciteit te bestuderen onderzocht. We hebben het nut van gist als modelsysteem om cellulaire toxiciteitsmechanismen te ontrafelen en om de rol van P450s in biotransformatie gerelateerde toxiciteit te onderzoeken bestudeerd. Hiervoor hebben we diclofenac als modelgeneesmiddel gebruikt. Diclofenac wordt veel gebruikt in de bestrijding van pijn en ontstekingen, bijvoorbeeld in reuma. Het gebruik van diclofenac kan echter ook tot zeldzame, maar ernstige bijwerkingen leiden. Vooral het bovenste deel van het maag-darmkanaal, de lever, het hart en de nieren kunnen schade ondervinden van diclofenac gebruik. Dit wordt mogelijk veroorzaakt door metabolisme door cytochroom P450s en schade aan de mitochondriën. De mechanismen, eiwitten en/of metabolieten betrokken bij de mitochondriële en P450-gerelateerde schade waren echter aan het begin van dit onderzoek nog niet bekend.

In **hoofdstuk 2** onderzoeken we allereerst de rol van mitochondriën in diclofenac toxiciteit in gist. In de mitochondriën doneren elektronrijke moleculen zoals NADH elektronen aan de ademhalingsketen. Deze elektronen worden uiteindelijk overgedragen aan zuurstof. Gedurende het elektrontransport worden protonen over het membraan gepompt wat tot een gradiënt

leidt dat gebruikt wordt voor energieproductie. Geneesmiddelen of andere lichaamsvreemde stoffen kunnen het elektrontransport remmen. De elektronen kunnen hierdoor weglekken waardoor onder andere ROS (“reactive oxygen species”) ontstaat. We laten in gist duidelijk zien dat diclofenac toxiciteit gekoppeld is aan de ademhalingsketen. Het zuurstofverbruik van de gistcellen neemt af na incubatie met diclofenac en de diclofenac toxiciteit neemt toe in cellen die meer afhankelijk zijn van de ademhalingsketen voor hun energieproductie. Bovendien verhoogt diclofenac de productie van ROS. Vooral de eiwitten Rip1p en Cox9p die onderdeel uitmaken van respectievelijk complex III en IV van de ademhalingsketen zijn belangrijk in diclofenac toxiciteit. Als een van deze twee eiwitten niet aanwezig is, is de groeiremming door diclofenac aanmerkelijk lager en ook de hoeveelheid zuurstof radicalen is verlaagd. Mogelijk bindt diclofenac in de buurt van Rip1p in complex III, waardoor het elektrontransport wordt geremd en de elektronen gaan lekken. Aangezien Rip1p erg lijkt op het humane eiwit RISP (UQCRFS1) is het interessant om te onderzoeken of RISP betrokken is bij diclofenac toxiciteit in humane cellen. Meer onderzoek is nodig om te begrijpen hoe Rip1p en Cox9p betrokken zijn bij de interferentie van diclofenac met de ademhalingsketen.

In **hoofdstuk 3** hebben we de rol van metabolisme door cytochroom P450s in diclofenac toxiciteit onderzocht. Aangezien gist zelf geen P450s bevat die diclofenac kunnen metaboliseren, hebben we hiervoor P450 BM3 M11 in gist tot expressie gebracht. BM3 M11 is een model P450 dat een vergelijkbaar diclofenac-metabolietprofiel geeft als humane P450s. Gistcellen die BM3 M11 tot expressie brachten groeiden significant langzamer in aanwezigheid van diclofenac dan controle stammen die met een lege vector getransformeerd waren. Ook de hoeveelheid ROS was significant hoger in cellen met BM3 M11 dan in cellen zonder dit enzym. Dit bevestigt dat P450 activiteit de toxiciteit van diclofenac verhoogt. Opvallend was dat de diclofenac metabolieten 4'- en 5-hydroxydiclofenac geen effect hadden op celgroei en de hoeveelheid ROS in cellen die BM3 M11 tot expressie brachten. De aanwezigheid van reactieve metabolieten van 4'- en 5-hydroxydiclofenac, de quinone imines, in de cellen werd bevestigd door detectie van hun glutathion conjugaten. Kennelijk zijn 4'- en 5-hydroxydiclofenac en hun reactieve quinone imines niet betrokken bij diclofenac toxiciteit in gist. Andere reactieve metabolieten zoals arene oxides of radicalen kunnen gevormd worden gedurende het metabolisme en zijn mogelijk verantwoordelijk voor de toegenomen toxiciteit van diclofenac in aanwezigheid van een P450. Vorming van diclofenac arene oxides en radicalen is ook beschreven in humane lever microsomen. In toekomstig onderzoek zouden BM3 mutanten met een ander metaboliet profiel gebruikt kunnen worden om te onderzoeken welke metabolieten verantwoordelijk zijn voor de toename in toxiciteit. Bovendien zou gist genetica gebruikt kunnen worden om te achterhalen welke genen betrokken zijn bij de P450-gerelateerde toxiciteit.

In **hoofdstuk 4** beschrijven we dat gistcellen kunnen adapteren aan diclofenac toxiciteit en wat de onderliggende mechanismen daarvoor zijn. Als gistcellen na een dag incuberen met 100 μM diclofenac worden verdund in vers medium en er wordt nogmaals 100 μM diclofenac toegevoegd, is het de tweede keer niet meer toxisch. Alhoewel de meeste cellen dood gaan na een eerste confrontatie met 100 μM diclofenac, kunnen sommige cellen het overleven en weer gaan groeien. Met behulp van microarrays hebben we de genen bestudeerd die bij dit adaptatie proces betrokken zijn. We vonden dat vooral genen behorende tot de groep Pleiotropic Drug Resistance (PDR) genen en genen gereguleerd door Rlm1p opgereguleerd waren in cellen die aan diclofenac geadapteerd zijn. Rlm1p is een transcriptie factor die deel uitmaakt van de Protein Kinase C (PKC) signaleringsroute die reageert op celwand stress. Om na te gaan of deze processen ook direct betrokken zijn bij diclofenac toxiciteit maakten we gebruik van gist deletiestammen en overexpressie constructen. Van de PDR genen was vooral het ABC-transport eiwit Pdr5p belangrijk voor de diclofenac tolerantie van de cellen. Deletie van twee verschillende componenten van de PKC signaleringsroute verhoogde diclofenac toxiciteit, terwijl incubatie met calcofluor white, een stof die celwand stress veroorzaakt, diclofenac toxiciteit verlaagde. Bovendien vormden de cellen drijvende vlokken in het medium na toevoeging van diclofenac, een fenomeen dat mogelijk de oorzaak is van de celwand stress. De expressie van genen die gevoelig zijn voor de zink-concentratie in de cel en van genen die betrokken zijn bij ribosoom biogenese en rRNA processing was lager in diclofenac-geadapteerde cellen. Dit laatste proces is een veelvoorkomend verschijnsel in door chemicaliën of door andere factoren gestreste cellen en hebben we niet verder bestudeerd. Interessant genoeg veroorzaakte deletie van de zink-gevoelige transcriptie factor Zap1p of toevoeging van de zink-chelerende stof 1,10-phenantroline een significante toename van diclofenac toxiciteit. Dit suggereert dat diclofenac initieel een tekort aan zink veroorzaakt of dat zink nodig is om de cel tegen diclofenac te beschermen. Aangezien diclofenac gebruik ook de zink niveaus in patiënten kan verlagen is het interessant om dit verder te onderzoeken. In conclusie, we hebben drie nieuwe processen geïdentificeerd die betrokken zijn bij de resistentie van gist tegen diclofenac, namelijk transport door Pdr5p, celwand stress en zink homeostasis. Doordat we geadapteerde cellen hebben gebruikt voor de microarray analyse voorkomen we detectie van voornamelijk celdood- en stress-gerelateerde genen. Deze aanpak kan ook nuttig zijn voor studies naar resistentie tegen andere geneesmiddelen of chemicaliën.

In **hoofdstuk 5** hebben we onderzocht of de mechanismen en eiwitten betrokken bij diclofenac toxiciteit die we in eerdere hoofdstukken geïdentificeerd hebben ook betrokken zijn bij de toxiciteit van andere geneesmiddelen. Daarvoor hebben we zeven geneesmiddelen geselecteerd die allemaal net als diclofenac tot de groep niet-steroïde, ontstekingsremmende geneesmiddelen (NSAIDs) behoren en een carbonzuur groep bevatten. De volgorde van toxiciteit van de acht geneesmiddelen in gist was vergelijkbaar met de volgorde beschreven

voor rat en menselijke cellen. We ontdekten grote verschillen in de betrokkenheid van mitochondriële toxiciteit, metabolisme door P450s en actief transport in de toxiciteit van deze geneesmiddelen. Aan de hand van hun toxiciteit-mechanismen verdeelden we de geneesmiddelen in drie groepen. Groep I bestaat uit diclofenac, indomethacine en ketoprofen. Hun toxiciteit wordt gedomineerd door de mitochondriële ademhalingsketen en ROS. Metabolisme door P450s verhoogt hun toxiciteit verder, terwijl ABC-transport eiwitten voor resistentie zorgen. Groep II bestaat uit ibuprofen en naproxen. Alhoewel mitochondriën en P450s ook betrokken zijn bij de toxiciteit van groep II geneesmiddelen, wordt hun toxiciteit ergens anders door gedomineerd. De collectie gist deletiestammen zou gebruikt kunnen worden om verder te onderzoeken wat de belangrijkste oorzaak van de toxiciteit van deze groep is. Interessant genoeg was ibuprofen het enige geneesmiddel in de selectie dat niet in staat was opregulatie van de PDR-genen te veroorzaken. Het is mogelijk interessant om dit verder te onderzoeken. Groep III bestaat uit sulindac, ketorolac en zomepirac. Deze drie stoffen zijn vrijwel niet toxisch in gist. Dus we vonden een grote variatie in de toxiciteitsmechanismen van een groep in structuur vergelijkbare geneesmiddelen. Meer onderzoek is nodig om erachter te komen of deze mechanistische verschillen ook relevant zijn in humane cellen.

Tot slot trekken we in **hoofdstuk 6** algemene conclusies, bespreken we de relevantie van de resultaten en doen we suggesties voor toekomstig onderzoek. Door de toenemende vraag naar veilige medicijnen met minimaal gebruik van proefdieren zijn nieuwe testsystemen voor toxiciteit nodig. Gist is een veelgebruikt model om genotoxiciteit te detecteren. Onze resultaten laten zien dat gist ook goed gebruikt kan worden om andere toxiciteitsmechanismen te bepalen. Alhoewel we zelf onze resultaten niet direct in humane cellen geverifieerd hebben, zijn er meerdere sterke aanwijzingen in de literatuur dat enkele van onze vindingen ook relevant zijn voor patiënten. Vooral de rol van Rip1p in mitochondriële toxiciteit, de vinding dat quinone imines niet schadelijk zijn voor cellen en de ontdekking dat zink betrokken is bij diclofenac toxiciteit zijn mogelijk ook belangrijk in zoogdiercellen. Ontwikkelingen in het verwijderen van complete gist signaleringsroutes of het toevoegen van humane routes in wild type of deletie stammen maken het mogelijk steeds “menschelijkere” gisten te ontwikkelen. Deze technieken en stammen zijn nieuwe en zeer nuttige hulpmiddelen in toxiciteitsonderzoek en in combinatie met zoogdiercellen kunnen zij onmisbare informatie opleveren met betrekking tot toxiciteitsmechanismen van geneesmiddelen en andere chemicaliën. Stammen die expressie van humane metabole enzymen en humane transporters combineren kunnen gebruikt worden om ADME te bestuderen in een humaan-relevant systeem. Vergelijkbare strategieën kunnen gebruikt worden om een “high-throughput” gist systeem op te zetten om voor farmacologische activiteit te screenen.

