

## VU Research Portal

### **Mistaken identity: Paracetamol induces amino acid starvation through mimicry of tyrosine and changes ubiquitin homeostasis**

Huseinovic, A.

2019

#### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

#### **citation for published version (APA)**

Huseinovic, A. (2019). *Mistaken identity: Paracetamol induces amino acid starvation through mimicry of tyrosine and changes ubiquitin homeostasis*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

#### **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

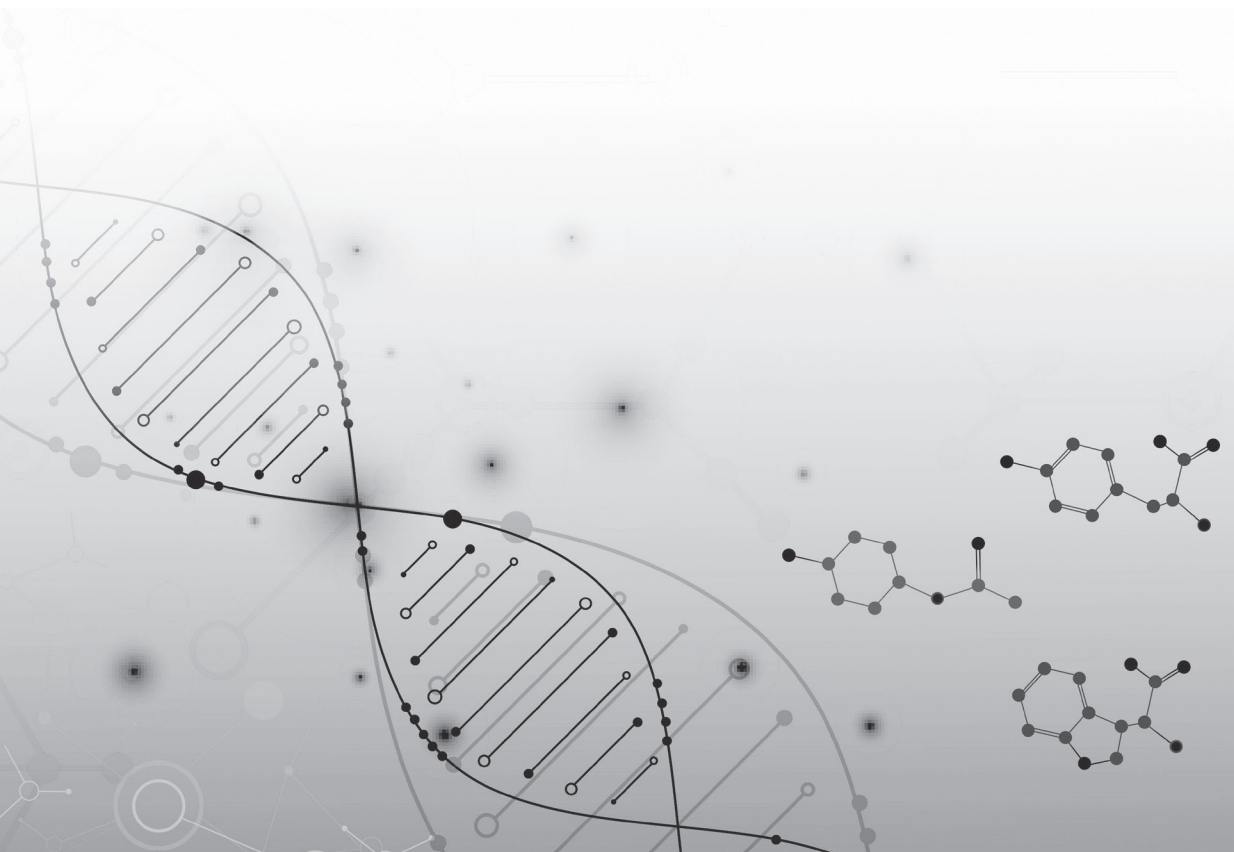
#### **Take down policy**

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](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# Nederlandse samenvatting



Paracetamol (acetaminophen, APAP) is een pijnstillend en koortsverlagend middel en over het algemeen wordt het bij therapeutische doses als veilig beschouwd. Niettemin is APAP overdosering een belangrijke oorzaak van acuut leverfalen wereldwijd (Yoon *et al.* 2016) wat voornamelijk is te wijten aan zijn vrije beschikbaarheid en aanwezigheid in vele medische formuleringen. Bij therapeutische doseringen wordt het grootste deel van de toegediende paracetamol in de lever omgezet in niet-toxische sulfaat- en glucuronzuur conjugaten, en een klein gedeelte van de dosis (ongeveer 4%) wordt omgezet door Cytochroom P450 (CYP) enzymen in toxische metabolieten, met name NAPQI. NAPQI wordt onschadelijk gemaakt door binding aan in de lever aanwezige glutathion (GSH), waarna het wordt uitgescheiden in de urine. Bij overdosering raken de sulfaat- en glucuronide-afbraakroutes echter verzadigd en treedt er een dermate extensieve vorming van NAPQI op wat leidt tot uitputting van de GSH voorraad. Onder deze omstandigheden kan NAPQI niet meer geneutraliseerd worden waardoor het covalent gaat binden aan eiwitten in de lever. Dit leidt tot oxidatieve stress, mitochondriale schade en het afsterven van levercellen door necrose (Jaeschke *et al.* 2012). APAP overdosering kan ook nierschade veroorzaken (Stollings *et al.* 2016) en bijwerkingen kunnen ook ontstaan bij therapeutische concentraties (Kato *et al.* 2014). De bijwerkingen bij therapeutische concentraties zijn zeldzaam, maar kunnen ernstig en levensbedreigend zijn, zoals Steven-Johnson-syndroom en toxische epidermale necrolyse (Khawaja *et al.* 2012; Biswal and Sahoo 2014). In de afgelopen jaren hebben verschillende epidemiologische cohortstudies gemeld dat langdurige gebruik van APAP tijdens zwangerschap een invloed kan hebben op de normale ontwikkeling van de pasgeborene en een verhoogde kans geven op ADHD, autisme, astma, en onvruchtbaarheid bij mannen later in het leven (Jensen *et al.* 2010; Snijder *et al.* 2012; Henderson and Shaheen 2013; Brandlistuen *et al.* 2013; Liew *et al.* 2014; Thompson *et al.* 2014; Sordillo *et al.* 2015; van den Driesche *et al.* 2015; Avella-Garcia *et al.* 2016; Ystrom *et al.* 2017). Hoewel APAP al voor vele decennia als een pijnstiller wordt gebruikt, is zijn farmacologische werking niet helemaal duidelijk. APAP wordt beschouwd als een selectieve COX-2-remmer vanwege de milde anti-inflammatoire werking, maar verschillende studies leverden ook echter een bewijs van remming van Cox-1 (Graham *et al.* 2013) wat een kenmerk is van niet-selectieve remmers. Naast de pijnstillende en

koortsverlagende eigenschappen, kan APAP ook psychologische toestand beïnvloeden door de gevoelens van empathie te verminderen (Durso *et al.* 2015; Mischkowski *et al.* 2016). Niet alle bijwerkingen kunnen worden verklaard door de werking van de toxische metabool NAPQI. Verschillende recente studies hebben vermeld dat APAP toxiciteit kan optreden voordat oxidatieve stress en GSH uitputting plaats hebben gevonden (Prill *et al.* 2016) en in systemen zonder werking en/of aanwezigheid van CYP enzymen die paracetamol kunnen omzetten naar NAPQI en andere toxische metaboliëten (Jensen *et al.* 1996; Srikanth *et al.* 2005; Miyakawa *et al.* 2015). De toxiciteit die veroorzaakt wordt door APAP zelf, dus niet zijn toxische metaboliëten, is een grotendeels onontgonnen gebied. Dit project is ontworpen om te kunnen bestuderen welke genen en biologische processen zijn betrokken en verantwoordelijk voor de NAPQI-onafhankelijke toxiciteit van APAP. Voor dit doel hebben we gist *Saccharomyces cerevisiae* gebruikt als modelorganisme: een eencellig eucaryotische organisme zonder CYP enzymen die APAP kunnen omzetten naar NAPQI, en met veel essentiële biologische processen die sterk zijn geconserveerd tussen gist en mens. Het uiteindelijke doel is om de bevindingen in gist te vertalen naar de mens.

In het eerste deel van **Hoofdstuk 1**, geven wij een algemene inleiding over APAP, zijn farmacologie, metabolisme, en een overzicht over de bijwerkingen, met de speciale aandacht voor NAPQI-afhankelijke en onafhankelijke toxiciteit. Verder geven wij ook een gedetailleerd overzicht over het gebruik van gist als modelorganisme om de “drug-induced” toxiciteit te bestuderen. Gist is de eerste eukaryoot die volledig werd gesequenced, ongeveer 80% van de genen zijn functioneel gekarakteriseerd en een volledige deletiestammen collectie van alle niet-essentiële genen is commercieel beschikbaar. In de loop der jaren werd gist bij diverse toxicologische studies gebruikt waardoor veel nuttige informatie is verzameld en wat heeft bijgedragen aan het begrijpen van de toxiciteitsmechanismen van verschillende geneesmiddelen en chemicaliën (Welsch *et al.* 2003; Wu *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2009; Dos Santos and Sá-Correia 2011; van Leeuwen *et al.* 2012; Nijman 2015; Segovia *et al.* 2017). In het tweede deel beschrijven we relevante biologische processen die betrokken zijn bij “drug-induced” toxiciteit, met speciale aandacht voor ubiquitin homeostase, stress

responsen die gereguleerd zijn door ubiquitineren, aminozuren sensing en signalering, het opname van nutriënten (met name aminozuren), en “nutrient starvation response”.

Het belangrijkste doel van dit onderzoeksproject was om de link tussen APAP toxiciteit en genotype te bestuderen om meer inzicht te krijgen in het mechanisme van NAPQI-onafhankelijke toxiciteit. Voor dat doel hebben we een chemogenomic screen uitgevoerd met een verzameling van 1522 *S. cerevisiae* deletiestammen, **Chapter 2**. Zo hebben we 107 APAP-resistente en 126 APAP-gevoelige deletiestammen kunnen identificeren, vergeleken met het wild type (WT). Vervolgens, door een Gene Ontology (GO) analyse te uitvoeren konden we “enrichment” van biologische processen vinden die betrokken zijn bij APAP toxiciteit. Ubiquitin homeostase, regulering van de transcriptie van RNA polymerase II-genen, en de retrograde signaling pathway (RTG) werden geassocieerd met APAP-resistentie, terwijl histon exchange en modificatie, en vesiculaire transport werden gerelateerd aan APAP gevoeligheid. Het verband tussen ubiquitin niveaus en APAP toxiciteit werd ook waargenomen en verder onderzocht door aan te tonen dat ubiquitin deficiëntie werd gerelateerd aan APAP-resistentie, terwijl ubiquitin overexpressie resulteerde in APAP-gevoeligheid. Een kleinschalig screen op een reeks van deletiestammen met ubiquitin deficiëntie (*mms2Δ*, *doa1Δ*, *ubi4Δ*, *doa4Δ* en *ubp6Δ*) werd gebruikt om chemogenomic profiel van verschillende chemicaliën te vergelijken met APAP en zijn isomeer AMAP, wat een uniek chemogenomic profiel voor APAP liet zien. Daarnaast zorgde de blootstelling aan APAP voor een verhoogd niveau van vrij ubiquitin in de cel en voor een veranderde ubiquitineren van eiwitten. Samen laten deze resultaten zien dat ubiquitin homeostase een rol speelt in APAP-geïnduceerde toxiciteit.

Ubiquitineren is betrokken bij de regulering van vele essentiële cellulaire processen zoals DNA reparatie, cel cyclus regulatie, eiwitafbraak door het proteasoom, genexpressie, degradatie van membraaneiwitten, en drug-induced toxicity. In het volgende deel van het proefschrift hebben we onderzocht welke van deze processen betrokken waren bij APAP-geïnduceerde toxiciteit. In **Chapter 3**, beschrijven we een kleinschalige chemogenomic screen, ontwikkeld op basis van deubiquitinasen (DUB) deletiestammen, om het chemogenomic

profiel van APAP te kunnen vergelijken met andere drugs/chemicaliën waarvan de mechanisme van toxiciteit (Mode of Action, MoA) bekend is. De screen was samengesteld uit 19 niet-essentiële DUB deletiestammen, evenals *ubi4Δ*, *mms2*, *rsp5-DAmP* en *doa1Δ*. De deletiestammen werden getest op gevoeligheid en resistentie tegen een reeks van verschillende geneesmiddelen en chemicaliën zoals APAP, kinine, ibuprofen, rapamycine, cycloheximide, cadmium, peroxide en aminozuren, en een clusteranalyse werd uitgevoerd. Het chemogenomic profiel van APAP was verschillend van drugs/chemicaliën die oxidatieve stress, DNA schade en/of translateremming veroorzaken, en vergelijkbaar met drugs/chemicaliën die leiden tot nutrient starvation response en afbraak van high affinity amino acid permease (AAP) Tat2. De chemogenomic screen onthulde ook een opmerkelijke overlap tussen het aminozuur tyrosine en APAP, maar niet de isomeer AMAP. Bovendien, de blootstelling van cellen aan zowel APAP als tyrosine gaf een versterkt effect op groeiremming, vergeleken met blootstelling aan alleen APAP of alleen tyrosine, wat suggereert dat APAP en tyrosine dezelfde MoA hebben.

In **Chapter 4**, bestuderen we verder of APAP een nutrient starvation response kon veroorzaken. Tijdens nutrient starvation response worden high affinity AAPs afgebroken via vacuolen, terwijl de expressie van de algemene AAP Gap1 omhoog gaat (Beck *et al.* 1999). Daarom hebben we onderzocht of de blootstelling aan APAP een effect had op de expressie niveaus van verschillende AAPs. We toonden aan dat tijdens de blootstelling aan APAP de eiwitniveaus van high affinity AAPs Tat2, Tat1, Mup1 en Hip1 werden verlaagd, terwijl de expressie van de algemene AAP Gap1 werd verhoogd, wat in overeenstemming was met een nutrient starvation response, **Chapter 4, Figure 1**. We hebben ook aangetoond dat vooral aromatische aminozuren betrokken waren bij de inductie van nutrient starvation: overexpressie van Tat1 en Tat2 (aromatische aminozuren transporters), maar niet van Mup1 (methionine transporter), Hip1 (histidine transporter) en Gap1 (algemene aminozuur transporter) gaf resistentie tegen APAP. Bovendien, een tryptofaan auxotrofe stam, *trp1Δ*, was gevoeliger voor APAP dan WT en de toevoeging van tryptofaan herstelde volledig de groeiremming van *trp1Δ* tijdens de blootstelling aan APAP. De toevoeging van tyrosine en phenylalanine had een additief effect op APAP toxiciteit, terwijl de

toevoeging van andere aminozuren geen significant effect had op de celgroei tijdens de blootstelling aan APAP. We ontwikkelden ook een HPLC-gebaseerde methode om intracellulaire niveaus van alle aminozuren tijdens APAP blootstelling te bepalen. We toonden aan dat de blootstelling aan APAP een daling van de intracellulaire concentraties van de meeste aminozuren veroorzaakte, met de uitzondering van Glu, Gln en Gly wiens niveau omhoog ging en wat in overeenkomst was met een nutrient starvation response. De afname van intracellulaire niveaus van aminozuren was minder aanwezig in APAP-resistente/ubiquitin-deficiënte deletiestammen die ook een verminderde afbraak van high affinity AAPs hadden. Tot slot, toonden wij een gelijkaardig effect van daling van intracellulaire aminozuur concentraties in menselijke hepatoma cellen, HepG2. In het bijzonder, aromatische en andere essentiële aminozuren hadden de grootste concentratiedaling wat wijst op een verminderde aminozuren opname. Deze resultaten geven nieuwe inzichten in de mechanismen van paracetamol toxiciteit en de potentiële betekenis en relevantie voor het begrijpen van paracetamol toxiciteit in mens.

In **Hoofdstuk 5** geven wij een samenvatting van het proefschrift, de conclusies en bespreken wij de belangrijkste bevindingen en bieden een perspectief en relevantie van ons werk.

## Verwijzingen

- Avella-Garcia, C.B., Julvez, J., Fortuny, J., Rebordosa, C., García-Esteban, R., Galán, I.R., Tardón, A., Rodríguez-Bernal, C.L., Iñiguez, C., Andiarena, A., Santa-Marina, L., Sunyer, J., 2016. Acetaminophen use in pregnancy and neurodevelopment: attention function and autism spectrum symptoms. *Int. J. Epidemiol.* 45, dyw115.
- Beck, T., Schmidt, A., Hall, M.N., 1999. Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell Biol.* 146, 1227–38.
- Biswal, S., Sahoo, S.S., 2014. Paracetamol induced Stevens-Johnson syndrome--toxic epidermal necrolysis overlap syndrome. *Int. J. Dermatol.* 53, 1042–4.
- Brandlistuen, R.E., Ystrom, E., Nulman, I., Koren, G., Nordeng, H., 2013. Prenatal paracetamol exposure and child neurodevelopment: a sibling-controlled cohort study. *Int. J. Epidemiol.* 42, 1702–13. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt183>
- Dos Santos, S.C., Sá-Correia, I., 2011. A genome-wide screen identifies yeast genes required for protection against or enhanced cytotoxicity of the antimalarial drug quinine. *Mol. Genet. Genomics* 286, 333–46.

- Durso, G.R.O., Luttrell, A., Way, B.M., 2015. Over-the-Counter Relief From Pains and Pleasures Alike: Acetaminophen Blunts Evaluation Sensitivity to Both Negative and Positive Stimuli. *Psychol. Sci.* 26, 750–8.
- Graham, G.G., Davies, M.J., Day, R.O., Mohamudally, A., Scott, K.F., 2013. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology* 21, 201–232.
- Henderson, A.J., Shaheen, S.O., 2013. Acetaminophen and asthma. *Paediatr. Respir. Rev.* 14, 9–15; quiz 16.
- Jaeschke, H., McGill, M.R., Ramachandran, A., 2012. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* 44, 88–106.
- Jensen, K.G., Poulsen, H.E., Doehmer, J., Loft, S., 1996. Paracetamol-induced spindle disturbances in V79 cells with and without expression of human CYP1A2. *Pharmacol. Toxicol.* 78, 224–8.
- Jensen, M.S., Rebordosa, C., Thulstrup, A.M., Toft, G., Sørensen, H.T., Bonde, J.P., Henriksen, T.B., Olsen, J., 2010. Maternal use of acetaminophen, ibuprofen, and acetylsalicylic acid during pregnancy and risk of cryptorchidism. *Epidemiology* 21, 779–85.
- Kato, H., Fujigaki, Y., Inoue, R., Asakawa, S., Shin, S., Shima, T., Furunishi, J., Higaki, M., Tanemoto, M., Yamaguchi, Y., Hoshimoto, K., Uozaki, H., Uchida, S., 2014. Therapeutic dose of acetaminophen as a possible risk factor for acute kidney injury: learning from two healthy young adult cases. *Intern. Med.* 53, 1531–4.
- Khawaja, A., Shahab, A., Hussain, S.A., 2012. Acetaminophen induced Steven Johnson syndrome-toxic epidermal necrolysis overlap. *J. Pak. Med. Assoc.* 62, 524–7.
- Liew, Z., Ritz, B., Rebordosa, C., Lee, P.-C., Olsen, J., 2014. Acetaminophen use during pregnancy, behavioral problems, and hyperkinetic disorders. *JAMA Pediatr.* 168, 313–20. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.4914>
- Mischkowski, D., Crocker, J., Way, B.M., 2016. From painkiller to empathy killer: acetaminophen (paracetamol) reduces empathy for pain. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 11, 1345–53. <https://doi.org/10.1093/scan/nsw057>
- Miyakawa, K., Albee, R., Letzig, L.G., Lehner, A.F., Scott, M.A., Buchweitz, J.P., James, L.P., Ganey, P.E., Roth, R.A., 2015. A Cytochrome P450-Independent Mechanism of Acetaminophen-Induced Injury in Cultured Mouse Hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354, 230–7. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.223537>
- Nijman, S.M.B., 2015. Functional genomics to uncover drug mechanism of action. *Nat. Chem. Biol.* 11, 942–948. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1963>
- Prill, S., Bavli, D., Levy, G., Ezra, E., Schmäzlin, E., Jaeger, M.S., Schwarz, M., Duschl, C., Cohen, M., Nahmias, Y., 2016. Real-time monitoring of oxygen uptake in hepatic bioreactor shows CYP450-independent mitochondrial toxicity of acetaminophen



- and amiodarone. *Arch. Toxicol.* 90, 1181–91. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1537-2>
- Segovia, R., Mathew, V., Tam, A.S., Stirling, P.C., 2017. Genome-wide bisulfite sensitivity profiling of yeast suggests bisulfite inhibits transcription. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 821, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.06.004>
- Snijder, C.A., Kortenkamp, A., Steegers, E.A.P., Jaddoe, V.W. V, Hofman, A., Hass, U., Burdorf, A., 2012. Intrauterine exposure to mild analgesics during pregnancy and the occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: the Generation R Study. *Hum. Reprod.* 27, 1191–201. <https://doi.org/10.1093/humrep/der474>
- Sordillo, J.E., Scirica, C. V, Rifas-Shiman, S.L., Gillman, M.W., Bunyavanich, S., Camargo, C.A., Weiss, S.T., Gold, D.R., Litonjua, A.A., 2015. Prenatal and infant exposure to acetaminophen and ibuprofen and the risk for wheeze and asthma in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 441–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.065>
- Srikanth, C. V, Chakraborti, A.K., Bachhawat, A.K., 2005. Acetaminophen toxicity and resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 151, 99–111. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27374-0>
- Stollings, J.L., Wheeler, A.P., Rice, T.W., 2016. Incidence and characterization of acute kidney injury after acetaminophen overdose. *J. Crit. Care* 35, 191–4. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2016.06.004>
- Thompson, J.M.D., Waldie, K.E., Wall, C.R., Murphy, R., Mitchell, E.A., ABC study group, 2014. Associations between Acetaminophen Use during Pregnancy and ADHD Symptoms Measured at Ages 7 and 11 Years. *PLoS One* 9, e108210. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108210>
- van den Driesche, S., Macdonald, J., Anderson, R.A., Johnston, Z.C., Chetty, T., Smith, L.B., Mckinnell, C., Dean, A., Homer, N.Z., Jorgensen, A., Camacho-Moll, M.-E., Sharpe, R.M., Mitchell, R.T., 2015. Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone production by the human fetal testis in a xenograft model. *Sci. Transl. Med.* 7, 288ra80.
- van Leeuwen, J.S., Vermeulen, N.P.E., Chris Vos, J., 2012. Yeast as a humanized model organism for biotransformation-related toxicity. *Curr. Drug Metab.* 13, 1464–75.
- Welsch, C. a, Hagiwara, S., Goetschy, J.F., Movva, N.R., 2003. Ubiquitin pathway proteins influence the mechanism of action of the novel immunosuppressive drug FTY720 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 26976–82.
- Wu, H.I., Brown, J.A., Dorie, M.J., Lazzeroni, L., Brown, J.M., 2004. Genome-wide identification of genes conferring resistance to the anticancer agents cisplatin, oxaliplatin, and mitomycin C. *Cancer Res.* 64, 3940–8.
- Yoon, E., Babar, A., Choudhary, M., Kutner, M., Pyrsopoulos, N., 2016. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 4, 131–42.

- Ystrom, E., Gustavson, K., Brandlistuen, R.E., Knudsen, G.P., Magnus, P., Susser, E., Davey Smith, G., Stoltenberg, C., Surén, P., Håberg, S.E., Hornig, M., Lipkin, W.I., Nordeng, H., Reichborn-Kjennerud, T., 2017. Prenatal Exposure to Acetaminophen and Risk of ADHD. *Pediatrics* 140, e20163840.
- Zhou, X., Arita, A., Ellen, T.P., Liu, X., Bai, J., Rooney, J.P., Kurtz, A.D., Klein, C.B., Dai, W., Begley, T.J., Costa, M., 2009. A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals pathways affected by arsenic toxicity. *Genomics* 94, 294–307.