



Samenvatting proefschrift **A.A.A. Adam**

'The Role of Mitochondria in the Hepatic Differentiation of Human Liver Cell Lines in BioArtificial Liver applications'

Promotiedatum: 4 oktober 2019
Universiteit van Amsterdam

Promotor:

Prof.dr. R.P.J. Oude Elferink

Copromotor:

Dr. R.A.F.M. Chamuleau
Dr. R. Hoekstra

Bioartificiële levers (BALs) zijn ontwikkeld voor de ondersteuning van leverfuncties van patiënten met eind-stadium leverfalen ter overbrugging tot levertransplantatie of tot herstel van de eigen lever (1). BAL systemen bestaan uit een bioreactor gevuld met een biocomponent met hoge leverfunctionaliteit die buiten het lichaam gekoppeld wordt aan de bloedcirculatie van de patiënt. De leverfuncties vereist voor effectieve BAL therapie zijn niet geheel opgehelderd, maar de ontgiftiging van ammoniak, bij voorkeur door ureum cyclus (UC) activiteit, en o.a. eiwitgebonden en vetoplosbare schadelijke stoffen, mitochondriale energie productie, die leidt tot melkzuur eliminatie, en de productie van belangrijke bloedeiwitten zijn waarschijnlijk cruciaal (2). Primaire humane hepatocyten (PHHs) zijn het meest geschikt als BAL biocomponent, maar vanwege de slechte verkrijgbaarheid en snelle achteruitgang van functies in kweek is een alternatieve bron voor levercellen nodig. Humane lever cellijnen vertonen meestal onbeperkte celgroei en zijn daarom een aantrekkelijk alternatief voor PHHs, maar hebben als nadeel dat ze grotendeels tekort schieten in complexe leverfuncties, ook wel lage differentiatiegraad genoemd (2). Momenteel worden twee humane levercellijnen gebruikt als biocomponent voor BAL systemen: de C3A cellijn voor de Extracorporeal Liver Assist Device (ELAD) en de HepaRG cellijn voor de AMC-BAL (3, 4). De C3A cellijn is een derivaat van de humane hepatoma cellijn HepG2 en vertoont een zeer lage differentiatiegraad (5, 6). De HepaRG cellijn vertoont daarentegen een aanmerkelijk hogere differentiatiegraad, en benadert met een aantal functies het niveau van PHHs. Desondanks zijn er nog een aantal functies niet optimaal. Het toxische ammoniak wordt efficiënt ontgift door inbouw in aminozuren, maar de gewenste, onomkeerbare ammoniak eliminatie via UC activiteit is relatief laag (3, 7). Daarnaast zijn ook diverse andere ontgiftings activiteiten relatief laag, vanwege de lage expressie van een aantal essentiële regulatiegenen, waaronder de constitutive androstane receptor (CAR). Verder vertoont de cellijn een beperkte stabiliteit tijdens celexpansie, het passeren van de cellen in kweek, waardoor de cellen hun capaciteit tot volledige uitrijping verliezen vanaf de kritieke passage P20.

Aan de publicatie van dit proefschrift werd een financiële bijdrage geleverd door de Nederlandse Vereniging voor Hepatologie.

Voor proefschriftsamenvattingen zie:
www.hepatologie.org

Teneinde humane lever cellijnen verder te verbeteren om te dienen als volwaardig biocomponent voor BAL toepassing, of voor andere toepassingen die functionele levercellen vereisen, zoals het modelleren van leverziektes en medicijn veiligheidsstudies, kunnen te lage functies specifiek opgeregeerd worden door genen die de relevante metabole routes limiteren tot overexpressie te brengen. Daarnaast kan een breder scala aan functies gecorrigeerd worden door kweekomstandigheden verder te optimaliseren of door lever transcriptie factoren tot overexpressie te brengen. Deze laatstgenoemde strategie heeft al een nieuwe cellijn opgeleverd, de HepaRG-CAR cellijn, die CAR overexpresseert, wat geleid heeft tot een verhoogde ontgiftingsactiviteit en albumine productie (8). Het doel van dit proefschrift was om biocomponenten van BAL systemen, de HepaRG en C3A cellijnen, te bestuderen, de factoren te bepalen die hun uitrijping limiteren en strategieën te ontwikkelen om hun leverfuncties te verbeteren, met speciale aandacht voor de rol van de energie huishouding.

Deel I van dit proefschrift bevat een inleiding en beschrijft de functionaliteit van HepaRG en C3A cellen in monolaag en BAL kweek en de associatie tussen mitochondriale energie huishouding en differentiatie.

Hoofdstuk 1 bevat een introductie in leverfalen, oorzaken en behandeling. Het concept van BAL behandeling, alsmede het AMC-BAL en ELAD systeem, worden kort beschreven. Verder worden verschillende bronnen voor hepatocyten behandeld en de vereiste criteria om te voldoen als biocomponent voor BAL systemen. Tenslotte wordt de associatie tussen mitochondriale energie huishouding en leverdifferentiatie geïntroduceerd.

In Hoofdstuk 2 vergeleken we de leverfuncties van HepaRG en C3A cellen in AMC-BAL en conventionele monolaag kweken. De functionaliteit van beide lijnen was sterk verbeterd door BAL kweken vergeleken met monolaag kweken. De HepaRG cellen vertoonden daarnaast hogere functionaliteit ten opzichte van C3A cellen, wat maakt dat HepaRG cellen te verkiezen zijn als BAL biocomponent.

Hoofdstuk 3 beschrijft in meer detail de achtergrond van de verhoogde functionaliteit van HepaRG cellen veroorzaakt door BAL kweken. Microarray analyse toonde aan dat het kweken in de BAL de transcriptie van genen betrokken bij mitochondriale energie huishouding verhoogt. Daarnaast was er een opregulatie van de hoeveelheid mitochondriën, expressie van oxidatieve fosforylering (OxPhos) complexen en mitochondriaal membraan potentiaal. De drie belangrijkste verschillen tussen BAL en monolaag kweken zijn de 3D vs 2D configuratie, de aan- vs afwezigheid van medium perfusie en de oxygenatiegraad (hoger in BAL). Alle drie factoren bleken bij te dragen aan verhoging van de hoeveelheid mitochondriën per cel in zowel HepaRG als C3A cellen, wat suggereert dat het stimuleren van mitochondriale biogenese een algemeen effect van BAL kweken is, onafhankelijk van de gebruikte biocomponent. Het effect van zuurstofconcentratie en mediumperfusie op leverfuncties en energiehuishouding werd verder bestudeerd en beschreven in de volgende hoofdstukken.

In Hoofdstuk 4 werd het effect van pericellulaire zuurstofconcentratie op de differentiatie van lever cellijnen HepaRG en C3A getest. Het kweken van HepaRG cellen onder hyperoxie (40%

Aan de publicatie van dit proefschrift werd een financiële bijdrage geleverd door de Nederlandse Vereniging voor Hepatologie.

Voor proefschriftsamenvattingen zie:
www.hepatologie.org

O₂), in plaats van de conventionele normoxie concentratie (20%O₂) verhoogde de lever differentiatie en functionaliteit. Hyperoxie induceerde de essentiële hepatische transcriptie factor CCAAT/enhancer-binding protein α (CEBP α) en verhoogde de translocatie naar de kern. De positieve effecten van hyperoxie op hepatische functionaliteit werden bevestigd in C3A cellen. Microarray analyse van het transcriptoom van HepaRG cellen gekweekt onder hyperoxie vs normoxie toonde aan dat slechts een selecte hoeveelheid genen differentiëel geëxprimeerd werd (1%), waaronder een aantal bekende lever-verrijkte transcriptie factoren. Dit wijst erop dat mogelijk post-transcriptionele processen een belangrijke rol spelen bij de verbeterde functionaliteit onder hypoxie. Het kweken onder hypoxie (5% O₂) leidde in HepaRG cellen juist tot verlaging van de differentiatie graad, kenmerkend voor lever-stamcellen. Deze onvolwassen staat werd bevestigd door de relatief hoge expressie en nucleaire translocatie van stamcel eiwit SOX9. Daar staat tegenover dat hypoxie condities tijdens het expanderen van de HepaRG cellen hun stabiliteit verhoogde, waardoor het verlies van functionaliteit, onder normoxie geobserveerd na passage P20, uitgesteld werd. Het effect van zuurstof op hepatische differentiatie wordt waarschijnlijk veroorzaakt door zuurstof-gevoelige factoren, zoals de hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α). De expressie en nucleaire translocatie van deze factor was inderdaad verhoogd in HepaRG cellen gekweekt onder hypoxie vs normoxie en hypoxie.

In Hoofdstuk 5 werd het effect van “dynamic medium flow”(DMF), het bewegen van medium, op hepatische differentiatie en energie huishouding bestudeerd. Medium perfusie verhoogde de mitochondriale biogenese, zoals geobserveerd bij BAL kweken (zie Hoofdstuk 3). Om het effect van DMF op leverfunctionaliteit van HepaRG en C3A cellen verder te bestuderen simuleerden we DMF van de BAL door monolaag kweken te schudden bij 60rpm tijdens de differentiatie fase, wat een makkelijke methode is. Deze nieuwe kweek strategie leverde substantiële verbeteringen op ten opzichte van conventioneel statische kweken van monolagen bij HepaRG cellen; de transcriptie van hepatische genen was verhoogd alsmede de nucleaire translocatie van hepatische transcriptie factor CEBP α . Bovendien waren leverfuncties verbeterd, waaronder ammoniak eliminatie, galzout productie en cytochroom P450 3A4 (CYP3A4) activiteit. Zoals eerder gevonden voor BAL kweken was er een sterke associatie tussen hepatische differentiatie en mitochondriale energie huishouding; DMF kweken veroorzaakte een verschuiving van glycolyse naar OxPhos, blijkens een afname van melkzuur productie en glucose consumptie en een verhoging van zuurstof consumptie. De positieve effecten van DMF op hepatische functionaliteit en mitochondriale energiehuishouding werden ook gevonden in C3A cellen.

In deel II van het proefschrift worden strategieën beschreven om HepaRG cellen middels genetische modificatie te verbeteren in leverfuncties die relatief laag zijn, zoals ontgiftings capaciteit, mitochondriale energie huishouding en UC activiteit.

In Hoofdstuk 6 onderzochten we het effect van lentivirale overexpressie van CAR, een bekende regulator van ontgifting en energie huishouding in HepaRG cellen. De nieuw ontwikkelde HepaRG-CAR cellen hadden een verbeterde galzout productie en verlaagde melkzuurproductie ten opzichte van de oorspronkelijke HepaRG cellen. Verder bleken HepaRG-CAR cellen in staat om hun capaciteit tot volledige differentiatie tien passages langer te behouden bo-

Aan de publicatie van dit proefschrift werd een financiële bijdrage geleverd door de Nederlandse Vereniging voor Hepatologie.

Voor proefschriftsamenvattingen zie:
www.hepatologie.org

ven de kritische passage P20, ten opzichte van HepaRG cellen. Middels RNA sequencing vonden we dat het transcriptoom van HepaRG-CAR cellen verhoogde expressie vertoonde van OxPhos genen en verlaagde expressie van glycolyse, hypoxia en cel-deling-geassocieerde genen ten opzichte van HepaRG cellen. Verder bleek CAR overexpressie te leiden tot verlaging van de mTORC1 signalering, welke betrokken is bij verhoging van celdeling en glycolyse en reductie van mitochondriale energie huishouding, wat een belangrijke rol kan spelen bij de totstandkoming van het HepaRG-CAR fenotype. Door RNA sequencing van vroege en late passages van HepaRG en HepaRG-CAR cellen vonden we dat het transcriptoom van HepaRG-CAR cellen weinig veranderde tijdens het passeren, in tegenstelling tot het transcriptoom van HepaRG cellen. Tijdens het passeren van HepaRG cellen verlaagde de expressie van hepatische genen en verhoogde de expressie van genen betrokken bij epitheliale-mesenchymale transitie. De stabiliteit van HepaRG-CAR cellen wordt mogelijk verklaard door een lager niveau van reactieve zuurstof radicalen (ROS), waarvan bekend is dat ze betrokken zijn bij verouderingsprocessen; het niveau van ROS was significant lager in HepaRG-CAR cellen vergeleken met HepaRG cellen.

In Hoofdstuk 7 hebben we onderzocht welke factoren de UC activiteit beperken in HepaRG cellen. Efficiënte ammoniak eliminatie via UC is zeer gewenst voor BAL toepassing, omdat op die manier ammoniak onomkeerbaar verwijderd wordt, wat essentieel is voor de behandeling van hyperammoniaemie (9), bij patiënten met leverfalen. In HepaRG cellen zijn de expressie en activiteit van drie UC enzymen laag ten opzichte van normale lever. Dit zijn: carbamoyl-phosphate synthase I (CPSI-groot mitochondriaal enzym), ornithine transcarbamoylase (OTC-klein mitochondriaal enzym) en arginase I (ARGI-cytoplasmatisch enzym). Waarschijnlijk vindt daardoor >95% van de ammoniak eliminatie plaats door middel van inbouw in aminozuren, wat echter reversibel is, en slechts een marginale fractie van de ammoniak wordt definitief verwijderd uit de circulatie door UC activiteit. HepaRG cellen bleken arginine dosis-afhankelijk om te zetten in ureum en OTC overexpressie verbeterde niet de ureum productie, waaruit bleek dat OTC en ARG niet het lage niveau van de UC activiteit in HepaRG cellen bepaalden. Onverwacht bleek dat CPS overexpressie mitochondriale stress veroorzaakte en hepatische differentiatie onderdrukte in HepaRG cellen gekweekt in conventionele statische monolagen. Dit was met name onverwacht omdat dit niet het geval was met de overexpressie van OTC, ook een mitochondriaal enzym, maar van lager moleculair gewicht. Het negatieve effect van CPS overexpressie bleek gecorrigeerd te kunnen worden door de cellen te kweken onder DMF condities, waardoor ook de ureumproductie >4 maal verhoogde, mogelijk doordat DMF mitochondriale biogenese stimuleerde (zie Hoofdstuk 5). Daarnaast werden ook de transcript niveaus van een aantal andere UC genen opgereguleerd onder deze condities. Op basis van deze gegevens concluderen we dat zowel het CPS niveau als statisch kweken, mogelijk door een te lage hoeveelheid mitochondriën, de UC activiteit beperken in HepaRG cellen.

Conclusies

Onze studie met het doel om meer inzicht te verkrijgen in de toepasbaarheid van humane levercellijnen als biocomponent voor BAL toepassing heeft geresulteerd in een aantal strategieën die de cellijnen verbeteren middels simpele, maar effectieve, kweekprocedures, gebaseerd op aanpassingen van zuurstofconcentratie en op DMF. Daarnaast verhoogde opregulatie

Aan de publicatie van dit proefschrift werd een financiële bijdrage geleverd door de Nederlandse Vereniging voor Hepatologie.

Voor proefschriftsamenvattingen zie:
www.hepatologie.org

van lever-specifieke processen de toepasbaarheid van HepaRG cellen: overexpressie van CAR resulteerde in verhoging van stabiliteit tijdens expansie van de cellen en verbeterde ontgifting en mitochondriale energiehuishouding, terwijl CPS overexpressie in combinatie met DMF-kweken de UC activiteit verhoogde. Als belangrijke gemeenschappelijke factor vonden we een positieve correlatie tussen mitochondriale biogenese en hepatische differentiatie.

References

1. Flendrig LM, la Soe JW, Jorning GG, Steenbeek A, Karlsen OT, Bovee WM, et al. In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates. *J Hepatol.* 1997;26(6):1379-92.
2. van Wenum M, Chamuleau RA, van Gulik TM, Siliakus A, Seppen J, Hoekstra R. Bioartificial livers in vitro and in vivo: tailoring biocomponents to the expanding variety of applications. *Expert Opin Biol Ther.* 2014;14(12):1745-60.
3. Hoekstra R, Nibourg GA, van der Hoeven TV, Ackermans MT, Hakvoort TB, van Gulik TM, et al. The HepaRG cell line is suitable for bioartificial liver application. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(10):1483-9.
4. Nibourg GA, Chamuleau RA, van Gulik TM, Hoekstra R. Proliferative human cell sources applied as biocomponent in bioartificial livers: a review. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(7):905-21.
5. Mavri-Damelin D, Damelin LH, Eaton S, Rees M, Selden C, Hodgson HJ. Cells for bioartificial liver devices: the human hepatoma-derived cell line C3A produces urea but does not detoxify ammonia. *Biotechnol Bioeng.* 2008;99(3):644-51.
6. Mavri-Damelin D, Eaton S, Damelin LH, Rees M, Hodgson HJ, Selden C. Ornithine transcarbamylase and arginase I deficiency are responsible for diminished urea cycle function in the human hepatoblastoma cell line HepG2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(3):555-64.
7. Nibourg GA, Hoekstra R, van der Hoeven TV, Ackermans MT, Hakvoort TB, van Gulik TM, et al. Increased hepatic functionality of the human hepatoma cell line HepaRG cultured in the AMC bioreactor. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(8):1860-8.
8. van der Mark VA, Rudi de Waart D, Shevchenko V, Elferink RP, Chamuleau RA, Hoekstra R. Stable Overexpression of the Constitutive Androstane Receptor Reduces the Requirement for Culture with Dimethyl Sulfoxide for High Drug Metabolism in HepaRG Cells. *Drug Metab Dispos.* 2017;45(1):56-67.
9. Matoori S, Leroux JC. Recent advances in the treatment of hyperammonemia. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;90:55-68.

Aan de publicatie van dit proefschrift werd een financiële bijdrage geleverd door de Nederlandse Vereniging voor Hepatologie.

Voor proefschriftsamenvattingen zie:
www.hepatologie.org