

University of Groningen

Addressing liver fibrosis by TRAIL targeted to hepatic stellate cells

Arabpour, Mohammad

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Arabpour, M. (2016). *Addressing liver fibrosis by TRAIL targeted to hepatic stellate cells*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Dutch summary

Rita Setroikromo ¹, Hidde J. Haisma ²

1. Department of Pharmaceutical Biology, University of Groningen, Groningen, The Netherlands

2. Department of Pharmaceutical Gene Modulation, University of Groningen, Groningen, The Netherlands

Samenvatting

De voornaamste complicaties bij patiënten met chronische leverziekte is leverfibrose. Activering van leverstellaatcellen (Hepatic Stellate Cells, HSC) en afzetting van extracellulaire matrix is het belangrijkste onderliggende mechanisme van leverfibrose. Leverfibrose leidt tot bijzonder hoge economische- en gezondheidslasten als gevolg van de kosten van een lever transplantatie, de enige therapeutische optie in het eindstadium van de ziekte. Daarom is het streven naar een werkbare alternatieve therapie om het fibrotische proces tegen te gaan gewenst. In dit proefschrift werd de toepassing van tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) derivaten en varianten getest als een mogelijke therapie tegen geactiveerde HSCs.

Activatie van HSCs speelt een belangrijke factor in de ontwikkeling van leverfibrose. HSCs activatie en overexpressie van apoptose inducerende receptoren, zoals TRAIL receptoren, waaronder DR4 en DR5, gaan vaak samen met als gevolg dat HSCs gevoeliger worden voor de apoptotische effecten van TRAIL agonisten.

De toepassing van TRAIL-agonisten is eerder beschreven als een mogelijke strategie voor het elimineren van geactiveerde HSC [1]. TRAIL agonisten zijn met succes gebruikt bij de behandeling van verschillende tumoren in klinische setting, wat de veiligheid voor toepassing bij de mens impliceert. Echter, om zowel de specifieke en efficiënte eliminatie van HSC in de fibrotische lever te waarborgen is verdere modificatie van TRAIL gewenst.

Een aantal groeifactoren spelen een rol bij de HSC proliferatie in de fibrotische lever en groeistimulerende receptoren komen in hoge mate tot expressie in geactiveerde HSCs. Vooral epidermale groeifactor (EGF) en bloedplaatjes-afgeleide groeifactor receptoren (PDGF) komen hoog tot expressie op het oppervlak van geactiveerde HSC [2] [3].

Op basis van deze waarnemingen, denken we dat koppeling van TRAIL aan antilichamen of peptiden, gericht tegen de groeifactorreceptoren, de efficiëntie van TRAIL verhoogd zal worden, zowel in specificiteit als in hoger bindingsvermogen. Het door een moleculaire koppeling geproduceerde fusie-eiwit zou specifiekere zijn en dus de geactiveerde HSC beter elimineren in de fibrotische lever. Bovendien zal door de TRAIL moleculen specifiek naar de HSCs te sturen er een minder toxisch effect van TRAIL op de gezonde hepatocyten zijn.

In hoofdstuk 2 van dit proefschrift beschrijven we de toepassing van een anti-EGFR enkele keten antilichaam, scFv, TRAIL fusie-eiwit voor de eliminatie van geactiveerde HSC [4]. De over-expressie van TRAIL receptoren op geactiveerde HSC's maken het een ideaal doelwit voor TRAIL agonisten. Wij en anderen hebben aangetoond dat TRAIL preferentieel apoptose kan induceren in geactiveerde HSCs. In dit hoofdstuk laten wij zien dat het elimineren van geactiveerde HSCs via de EGF-Receptor (EGFR) signaalroute gecombineerd met activatie van de caspase route door TRAIL tot efficiënte eliminatie van HSCs leidt. Interessant is dat de waargenomen verhoogde apoptose van geactiveerde HSC verlaagd kon worden door de EGFR signaleringsroute remmen. Deze bevinding benadrukt het belang van de combinatie van apoptose inductie en proliferatie remming.

De toepassing van scFvs voor specifieke binding van TRAIL was succesvol, zoals beschreven in hoofdstuk 2. Echter, antilichamen met hoog molecuulgewicht hebben een beperkte weefselpenetratie en zijn species-specifiek. Dit kan nadelig zijn voor toepassingen in *in vivo* modellen en in de kliniek. In plaats van anti-EGFR scFv zijn er andere liganden getest, zoals peptiden die de PDGF receptor en EGF-receptor herkennen. Deze worden beschreven in hoofdstuk 3 [5-7]. Deze peptiden werden getest in de vorm van moleculaire fusie-eiwitten met TRAIL. Anti-EGFR peptide scFv-TRAIL receptor fusie-eiwitten gaven geen verbetering van de TRAIL efficiëntie voor het elimineren van geactiveerde HSCs. Het EGFR expressie level, de mate van turnover of de internalisatie snelheid van de receptor was niet van invloed op de efficiëntie van deze TRAIL fusie-eiwitten in het elimineren geactiveerde HSC. Daarentegen correleerde de mate van binding van TRAIL aan HSCs met de efficiëntie van deze TRAIL fusie-eiwitten en het induceren van caspase-afhankelijke apoptose in geactiveerde HSCs.

De experimenten beschreven in hoofdstuk 4 zijn gericht op het bepalen van de rol van specifieke TRAIL receptoren in de eliminatie van geactiveerde HSC. De gepresenteerde resultaten leveren het bewijs dat er meer dan één receptor systeem betrokken is bij de apoptose-inductie van TRAIL in geactiveerde HSC. De DR5-receptoren bleek de meest voorkomende receptor op het oppervlak van geactiveerde HSCs te zijn. Het gebruik van DR5-selectieve TRAIL mutanten zou voordeel bieden om dit type cel te elimineren. Een aanzienlijke daling van de overleving van Lx2 HSCs werd gevonden na blootstelling aan DR5-specifiek en wt TRAIL, terwijl DR4-specifieke TRAIL slechts een marginaal effect had op de overleving van Lx2

cellen. De daling in overleving als gevolg van blootstelling met verschillende TRAIL varianten correleerde met een toename van caspase 3/7 activatie en annexine V kleuring in HSC. Deze resultaten suggereren dat de verschillende varianten van TRAIL de geactiveerde HSCs doden via caspase-geassocieerde apoptoseroutes. Deze bevinding sluit aan bij de functionele rol van TRAIL in de inductie van de celdood via de extrinsieke caspase route en caspase-8 afhankelijke activering [8].

TRAIL in niet-toxische concentraties bleek de productie van extracellulaire matrix te verminderen door te interfereren met collageen specifieke HSP47 vouwing mechanismes [9]. Onze *in vitro* studies tonen aan dat alle TRAIL varianten de expressie van pro-fibrotische genexpressie verlagen, zoals collageen I en α -SMA. Echter, DR5-specifiek en wt TRAIL bleken hierin het meest effectief. Een verlaging van collageen I en α -SMA productie door behandeling met receptor-specifiek of wt TRAIL correleerde met een afname van HSP 47. Samengevat, pleiten de gepresenteerde bevindingen voor de toepassing van de DR5-receptor specifieke variant van TRAIL voor het elimineren van geactiveerde HSC via interventie met de productie van collageen en gelijktijdige inductie van apoptose via activatie van de caspase route.

In hoofdstuk 5, werd een combinatie van TRAIL varianten met inhibitoren voor histon acetyltransferase (HAT) of Deacetylase (HDAC) gebruikt voor het evalueren van de potentiële toepassing van verschillende epigenetische veranderingen op TRAIL geïnduceerde apoptose in een carcinoma cellijn. De gecombineerde behandeling van carcinoma cellijnen met verschillende TRAIL varianten en de

HDAC remmer SAHA maakte de cellen gevoeliger voor apoptose. We vonden dat de expressie van TRAIL receptoren DR-4 en DR-5 werd geïnduceerd door verschillende HDAC remmers [10] [11] [12]. De receptor specificiteit van de TRAIL varianten droeg niet significant bij aan de toxiciteit in aanwezigheid van SAHA. Een lage concentratie van de HAT remmer C646 verhoogde de TRAIL geïnduceerde cytotoxiciteit in meerdere carcinoma cellijnen. Kortom, de combinatie van HAT-remmers en TRAIL vormt een krachtige apoptotische stimulus in menselijke carcinoom cellen.

Samenvattend, in dit proefschrift laten we zien dat TRAIL gebruikt kan worden in de therapie voor leverfibrose: Ten eerste kan een specifieke vorm van TRAIL gebruikt worden voor het selectief induceren van caspase afhankelijke apoptose in geactiveerde HSCs en niet in gezonde levercellen. Ten tweede kan TRAIL verschillende processen moduleren zoals extracellulaire matrix productie en proliferatie in geactiveerde HSCs. Aldus kan de dubbele functionaliteit van TRAIL als geneesmiddeltherapie succesvol worden benut en vormt een nieuwe benadering voor de behandeling van leverfibrose.

Referenties

- [1] Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* 2003;37:87–95. doi:10.1053/jhep.2003.50002.
- [2] Tugues S, Fernandez-Varo G, Muñoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodés J, et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007;46:1919–26. doi:10.1002/hep.21921.
- [3] Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:255–73. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.03.006.
- [4] Arabpour M, Poelstra K, Helfrich W, Bremer E, Haisma HJ. Targeted elimination of activated Hepatic Stellate Cells by an anti-EGF-receptor scFv-sTRAIL fusion protein. *J Gene Med* 2014;1–30. doi:10.1002/jgm.2776.
- [5] Kopansky E, Shamay Y, David A. Peptide-directed HPMa copolymer-doxorubicin conjugates as targeted therapeutics for colorectal cancer. *J Drug Target* 2011;19:933–43. doi:10.3109/1061186X.2011.632011.
- [6] Li Z, Zhao R, Wu X, Sun Y, Yao M, Li J, et al. Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *FASEB J* 2005;19:1978–85. doi:10.1096/fj.05-4058com.
- [7] Bansal R, Tomar T, Ostman A, Poelstra K, Prakash J. Selective targeting of interferon γ to stromal fibroblasts and pericytes as a novel therapeutic approach to inhibit angiogenesis and tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2012;11:2419–28. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0758.
- [8] Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 2006;130:435–52. doi:10.1053/j.gastro.2005.10.055.
- [9] Park SJ, Sohn HY, Park SI. TRAIL regulates collagen production through HSF1-dependent Hsp47 expression in activated hepatic stellate cells. *Cell Signal* 2013;25:1635–43. doi:10.1016/j.cellsig.2013.04.001.

- [10] Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Gelmetti V, Marchesi F, Viale A, et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 2005;11:71–6. doi:10.1038/nm1160.

- [11] Shetty S, Graham BA, Brown JG, Hu X, Vegh-Yarema N, Harding G, et al. Transcription factor NF-kappaB differentially regulates death receptor 5 expression involving histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 2005;25:5404–16.

- [12] Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007;26:5541–52. doi:10.1038/sj.onc.1210620.

- 1: **Arabpour M**, Poelstra K, Helfrich W, Bremer E, Haisma HJ. Targeted elimination of activated hepatic stellate cells by an anti-epidermal growth factor-receptor single chain fragment variable antibody-tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (scFv425-sTRAIL). *J Gene Med.* 2014 Sep-Oct;16(9-10):281-90. doi: 10.1002/jgm.2776. PubMed PMID: 25088657.
- 2: Karimi MH, Motazedian M, Geramizadeh B, Nikeghbalian S, Yaghobi R, Abedi F, Hossin Aghdaee M, Azarpira N, **Arabpour M**, Malekpour Z, Namayandeh M. Association of the Co-stimulatory Molecules Polymorphisms with CMV Infection in Liver Transplant Recipients. *Int J Organ Transplant Med.* 2011;2(4):171-7. PubMed PMID: 25013611; PubMed Central PMCID: PMC4089271.
- 3: Moattari A, Aleyasin S, **Arabpour M**, Sadeghi S. Prevalence of human Metapneumovirus (hMPV) in children with wheezing in Shiraz-Iran. *Iran J AllergyAsthma Immunol.* 2010 Dec;9(4):250-4. doi: 09.04/ijaai.251254. PubMed PMID:21131706.
- 4: Moattari A, Ashrafi H, Kadivar MR, Kheiri MT, Shahidi M, **Arabpour M**, Ghanbari A. Antigenic variations of human influenza virus in Shiraz, Iran. *Indian J MedMicrobiol.* 2010 Apr-Jun;28(2):114-9. doi: 10.4103/0255-0857.62486. PubMed PMID: 20404455.
- 5: **Arabpour M**, Samarbafzadeh AR, Makvandi M, Shamsizadeh A, Percivalle E, Englund J, Latifi SM. The highest prevalence of human metapneumovirus in Ahwaz children accompanied by acute respiratory infections. *Indian J Med Microbiol.* 2008 Apr-Jun;26(2):123-6. PubMed PMID: 18445946.

Since I was a child I was so curious and tried to discover the mechanisms behind the working things. However most of the times it turned to be destroying things and understand less out of them. Still after years I feel turn of events did not quench my thirst for knowing more, yet it changed my approach on how to learn and analyse phenomenons in a more mature and scientific manner. In this long journey of mind I am especially indebted to those whome gave me their unlimited support and patiently taught me how to proceed further after failures.

It is with immense gratitude that I acknowledge the support and help of my promotor Prof. Hidde J Haisma who kindly provide me with the chance of conducting this PhD program in his group. Dear Hidde this was my great pleasure to work under your supervision. You continually conveyed an excitement in regard to teaching. Working with you gave me the chance to grow my creativity and broaden my scientific vision for solving ahead scientific challenges. Without your guidance and persistent help this thesis would have been not possible.

It gives me great pleasure in acknowledging the support and help of my other promotor Prof. Klaas Poelstra. Dear Klaas I thank you for your helping me during my PhD in Groningen. I learnt a lot from your knowledge in fibrosis and targeting techniques during our work discussion.

I consider it an honor to work with Prof. Klaas Nico Faber. I thank you dear Klaas Nico for your helping me during my program. I find you very knowledgeable in your field and working with you I had the chance to grow my understanding of working mechanisms behind liver fibrosis.

I would like to have a special thank from Dr. Robert Cool. Dear Robert I have always been fascinated by your cool temper in all condition. Besides, I enjoyed learning from you especially in regard to your indepth knowledge in molecular aspects of TRAIL.

I am indebted to my many colleagues who supported me during this program. In my daily work I have been blessed with a friendly and cheerful group of fellow students and colleagues in the departments of Pharmaceutical Gene Modulation, department of Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting and department of Pharmaceutical Biology including but not limited to Frank, Janine, Thea, Nicolas, Niek, Petra, Mehran, Marilena, Hannah, Rosalina and Peter. In the Pharmaceutical Biology laboratory. I have been aided for quite some time in running the equipment by Rita, a fine technician who also helped me learning confocal microscopy techniques. I also would like to have my special thanks for her great contribution in assisting me in writing and editing a part of the thesis.

This thesis is dedicated to my parents who have given me the opportunity of an education from the best institutions and supported me financially and spiritually throughout this program and my entire life.

I started my research with detection and characterization of genetic and antigenic variation that anchors in seasonal Influenza virus sample. Amplification of virus samples by viral culture, genomic extraction, amplification and sequencing of virus Hemagglutinin (HA), a surface antigenic protein, was a common practice. By making genomic alignment of extracted strains with seasonal vaccine strain we could detect potential antigenic shift or drift in obtained influenza samples. Data from our studies used to evaluate the efficiency of seasonal flu vaccine in preventing Influenza.

I continued my line of research by engaging a project for construction influenza cross protective vaccine that could simultaneously confer protection against more than one type of influenza virus. For this reason in a collaboration with Molecular Virology Group, UMCG we designated and produced recombinant Influenza nucleoprotein (NP), a conserved internal influenza protein, using highly efficient Baculovirus expression method for further incorporation into cross protective virosome vaccine.

Later on, I started my PhD on the topic of Development of Gene Therapy for the curing of Liver Fibrosis. Briefly I investigate the potential application of single chain antibody (scFv) –Tumor necrotic factor ligand (TRAIL) fused protein in targeted elimination of activated hepatic stellate cells (a cell type responsible for liver fibrosis). By incorporation of above protein as a payload into Adenoviral vector for further delivery and expression into liver we evaluate elimination of targeted cell type both *in-vitro* and *ex-vivo*.