

Drug induced liver injury: Relevance of the interindividual differences in expression of the ABC-transporters

Doctoral Thesis

Author(s):

Meier, Yvonne

Publication date:

2005

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005089186>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO 16178

**Drug induced liver injury: Relevance of the interindividual
differences in expression of the ABC-Transporters**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

YVONNE MEIER

Eidg. Dipl. Apothekerin

Born 23.09.1972

Citizen of Gempen, SO

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Folkers, examiner

Prof. Dr. P.J. Meier-Abt, co-examiner

Prof. Dr. H. Möhler, co-examiner

2005

Zusammenfassung

Der Arzneimittel induzierte Leberschaden ist wegen seiner hohen Mortalität und Morbität ein wichtiges Problem in der Klinik und eine grosse Herausforderung für die Arzneimittelsicherheit. In einer epidemiologischen Studie wurde der medikamentöse Leberschaden mit Hilfe der SAS/CHDM Datenbank von uns untersucht (**Kapitel 2**): Rund 1% der hospitalisierten Patienten entwickelte im Spital einen Arzneimittel induzierten Leberschaden. Die Inzidenz des medikamentösen Leberschadens lag dabei höher als bei Untersuchungen in ambulanten Patienten. Nur in etwa 40% wurde eine Arzneimittel induzierte Leberwerterhöhung im Austrittsbericht vermutet, was zusätzlich darauf hinweist, dass der medikamentöse Leberschaden oft unterschätzt wird. Die gefundenen Leberschäden konnten aufgrund der Richtlinien der Consensus Konferenz des Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMs) in 65 % als hepatozelluläre Schäden und in 35 % als Cholestase oder gemischte Form eingeteilt werden.

Die pathophysiologischen Mechanismen, welche zum medikamentösen Leberschaden führen sind in den meisten Fällen nicht bekannt. Andererseits weiss man, dass hepatische Transporter als hepatozelluläre Aufnahme- wie auch biliäre Sekretionssysteme agieren und so die Clearance von verschiedenen Arzneimittel beeinflussen. Es ist deshalb denkbar, dass sie potentiell wichtige Determinanten sind für den Arzneimittel induzierten Leberschaden. 30 bis 50% der medikamentösen Leberschäden äussern sich als Cholestase. Pathophysiologisch liegt beim cholestatischen Leberschaden eine Beeinträchtigung der hepatozellulären Gallebildung vor. Diese äussert sich klinisch in einer Retention von gallepflichtigen Substanzen wie z.B. Gallensäuren oder Bilirubin im Blut. Gewisse kanalikuläre ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter spielen eine zentrale Rolle für die Sekretion von cholephilen Substanzen: die Gallensäuren Exportpumpe BSEP (*ABCB11*), die Phospholipidflippase MDR3 (*ABCB4*) und der organische Anionentransporter MRP2 (*ABCC2*). BSEP ist das dominierende Sekretionssystem für Gallensäuren und bestimmt den Gallensäuren abhängigen Gallenfluss. MDR3 ist eine ATP-abhängige Phospholipidflippase, welche Phosphatidylcholine von der inneren Membranlamelle an die äussere transportiert. Die Funktion der beiden Transporter ist eng aneinander gekoppelt: Die biliäre Phospholipidkonzentration nimmt mit gesteigerter Gallensäuren Sekretion zu. MRP2 ist ein multispezifischer Transporter für ein breites Spektrum von organischen Anionen (z.B. Bilirubindiglucuronide, Phase II Metaboliten) und ist damit wichtig für den Gallensäuren unabhängigen Gallefluss. Eine funktionelle

Beeinträchtigung dieser Transportsysteme kann zu einer Retention und intrazellulären Akkumulation von potentiell toxischen cholephilen Substanzen führen, welche dann eine Leberzellschädigung verursachen kann. Mutationen in kanalikulären ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter haben sich als der pathophysiologische Mechanismus für verschiedene familiäre cholestatische Syndrome etabliert, wie die progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ II und III (PFIC2 und 3), die benigne rekurrende intrahepatische Cholestase Typ II (BRIC2) sowie das Dubin-Johnson Syndrome. Es wird angenommen, dass ähnlich zu den familiären Cholestasen, die Variabilität der Transportprotein Expression an der kanalikulären Membran zu einer unterschiedlichen Empfindlichkeit für erworbene Cholestase Formen führt.

Eine mögliche pathogenetische Rolle der kanalikulären ABC Transporter für die Arzneimittel induzierte Cholestase wurde bislang nicht untersucht. Es gibt verschiedene Hinweise, dass Arzneimittelinteraktionen mit diesen Transportern zu einer Cholestase führen können. Medikamente wie Cyclosporin A, Rifampicin oder Bosentan welche auch beim Menschen eine Cholestase induzieren können, hemmen den Taurocholate Transport in BSEP exprimierenden Insektenzellen (Sf9-Zellen). Verminderte MDR3 Funktion wird als möglicher Mechanismus für durch Antikonzeptiva induzierte Cholestase vermutet, da sie bei jungen Frauen auftrat, bei welchen in der Familienanamnese eine Schwangerschafts- oder familiäre Cholestase (PFIC3) beschrieben wurde. Ferner wurde in verschiedenen Modellen gezeigt, dass Estradiol-17 β -Glucuronid als Transinhibitor mit BSEP interagiert, nachdem es durch MRP2 in die Galle sezerniert wurde. Neben der verminderten MDR3 Funktion, scheint dies ein zusätzlicher pathophysiologischer Mechanismus für die Estrogen assoziierte Cholestase zu sein.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, eine mögliche pathogenetische Rolle der kanalikulären ABC Transporter für die Arzneimittel induzierte Cholestase sowie andere erworbene Cholestase Formen zu untersuchen. Wir selektionierten *ABCB11*, *ABCB4* und *ABCC2* als „Candidate Genes“, da BSEP und MDR3 essentiell sind für die Gallenbildung und eine verminderte Funktion durch die Leberzelle nicht substituiert werden kann. Eine MRP2-Dysfunktion wird zwar durch andere hepatische Transportsysteme (z.B. MRP3, MRP4) kompensiert, trotzdem scheint MRP2 für gewisse erworbene Cholestasen wichtig zu sein (z.B. Antikonzeptiva und Schwangerschaft induzierte Cholestase). Unsere Hypothese war, dass tiefe kanalikuläre BSEP- und MDR3-Expression die wichtigsten Phentypen sind für eine eingeschränkte Gallenbildung, während für die Antikonzeptiva- oder Schwangerschaft assoziierte Cholestase (=Estrogen induzierte Cholestase) eine erhöhte MRP2 Expression

zusätzlich wichtig sein könnte. Es sollte erstens untersucht werden, ob solche Phenotypen in der normalen Bevölkerung existieren und zweitens, ob diese Phenotypen mit Polymorphismen der ABC-Transporter korreliert sind. Dazu wurde die interindividuelle Variabilität der Expression von BSEP, MDR3 und MRP2 in normalen Lebergewebe von 110 hepatektomierten Patienten mittels Westernblot Analyse in Relation zu häufigen nicht synonymen Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) getestet (**Kapitel 3**). Durch die Resultate dieser Analyse konnten zwei Hauptaussagen gemacht werden: Erstens, es gibt Individuen in der Bevölkerung, bei welchen BSEP oder MDR3 niedrig exprimiert sind, und zweitens, es gibt SNPs, welche für die Expression von kanalikulären ABC-Transporter relevant sein können: Niedrige BSEP Expression ist assoziiert mit der A444 Variante (C-Allel) des *ABCB11* SNPs 1457 T>C (V444A) und höhere MRP2 Expression mit der E1188 und Y1515 Varianten der *ABCC2* SNPs 3600 T>A (V1188E) und 4581 G>A (C1515Y).

Das nächste Ziel war es nun zu zeigen, ob diese SNPs pathogenetisch relevant sind für eine erworbene Cholestase (**Kapitel 4**). Es wurde DNA aus Blut von 65 cholestatischen Patienten isoliert, davon hatten 19 eine Arzneimittel-, 41 eine Schwangerschafts- und 5 eine Antikonzeptiva induzierte Cholestase. Nachdem *ABCB11* und *ABCB4* vollständig durchsequenziert wurden, konnten 3 Patienten mit einer Cholestase assoziierten *ABCB11* Mutation und 7 mit einer *ABCB4* Mutation ausgeschlossen werden. In den übrigen 55 cholestatischen Patienten verteilte sich der 1457T>C (V444A) Polymorphismus signifikant unterschiedlich im Vergleich zu nicht-cholestatischen Kontrollen. Das 1457C-allel war mit 75 % signifikant höher in Patienten mit erworbener Cholestase (Arzneimittel 71%, Schwangerschaft 75%, Antikonzeptiva 100%) als in Kaukasiern (57%), Frauen mit normalem Schwangerschaftsverlauf (51%) und Patienten mit hepatozellulären Leberschaden (54%). Zusätzlich konnten wir einen deutlichen Trend für höhere Serum Gallensäuren in Patienten mit mindestens einem 1457C-Allel im Vergleich zu Patienten mit mindestens einem T-Allel zeigen. Entsprechend den Expressionsdaten könnten die höheren Serum Gallensäuren in der A444 Variante durch eine verminderte BSEP Expression erklärt werden. Aufgrund unserer Resultate konnten wir einerseits schliessen, dass ähnlich wie bei den familiären Cholestasen, eine verminderte BSEP Expression ein prädisponierender Risikofaktor für Cholestase ist, und dass *ABCB11* SNP 1457T>C (V444A) ein pathogenetischer Marker für eine erworbene Cholestase ist. Die beiden *ABCC2* SNPs 3600 T>A (V1188E) und 4581 G>A (C1515Y) haben potentiell den grössten pathophysiologischen Einfluss für die Schwangerschafts oder Antikonzeptiva assoziierte Cholestase. Es wurde aber keine unterschiedliche Genotypen Verteilung zwischen den Patienten und Kontrollen gefunden. Unsere Daten weisen darauf hin,

dass es für die Estrogen assoziierte Cholestase keine häufige genetische Prädisposition in der Population gibt.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass eine polymorphe BSEP Expression ein erhöhtes Risiko für verschiedene Formen der erworbenen Cholestase darstellt, während für eine verminderte MDR3 Funktion hauptsächlich Mutationen wichtig sind. Die Rolle von MRP2 bleibt kontrovers: Verminderte Aktivität kann die hepatische Clearance von potentiell toxischen Substanzen verändern. Andererseits könnte eine erhöhte Aktivität relevant sein für gewisse Formen der Cholestase.

Summary

Drug-induced liver injury (DILI) is an important clinical problem with significant morbidity and mortality. It still accounts for up to 10% of all reports of adverse drug effects. During screening of a pharmacoepidemiological database consisting of medical inpatients, we found that 1 in 100 patients exhibited DILI during hospitalization (**Chapter 2**). This incidence rate was higher than previously described for outpatients. Moreover, only 40% of increased liver parameters were suggested as possibly drug-induced in the discharge letter, demonstrating that DILI is often underreported by clinicians. According to the consensus conference of the Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMs), the DILI cases could be subdivided into hepatocellular liver injury in about 65% of patients while 35% were cholestatic or mixed depending upon serum biochemistry markers.

In most cases of drug-induced hepatic injury, the pathophysiological mechanisms are poorly understood. On the other hand, it is now evident that hepatocellular transport systems are important in controlling hepatic drug exposure as well as hepatic drug clearance and, therefore constitute a possible determinant of drug-induced liver injury. About 30-50% of patients with DILI exhibit a cholestatic pattern, which involves impaired bile formation resulting in retention of cholephilic compounds in blood such as bile acids or bilirubin. Under physiological conditions, the secretion of bile salts and other bile constituents across the canalicular membrane of hepatocytes is mediated by various ATP-Binding Cassette (ABC)-transporters: the bile salt export pump BSEP (*ABCB11*), the phospholipid flippase MDR3 (*ABCB4*) and the organic anion transporter MRP2 (*ABCC2*) are important players in this process. BSEP appears to be the predominant bile salt efflux system of hepatocytes and mediates bile salt-dependent bile flow, whereas MDR3 acts as an ATP-dependent phospholipid flippase, translocating phosphatidylcholine from the inner to the outer leaflet of the canalicular membrane. MRP2 is a multispecific organic anion transporter and mediates the transport of a broad spectrum of compounds including bilirubin diglucuronide and thereby, contributes most to the bile salt-independent bile flow. Any functional disturbance of these transport systems can lead to intracellular accumulation of potentially harmful exogenous and endogenous compounds and constitute a risk for the development of toxic liver cell damage. It is now established that mutations in genes encoding for canalicular ABC-transporters are the underlying mechanism of familial cholestatic syndromes, such as progressive familial intrahepatic cholestasis type II and III (PFIC2 & 3), benign recurrent

intrahepatic cholestasis II (BRIC2) and Dubin-Johnson syndrome. Expression levels of these transporters are suggested to be crucial to maintain their physiological role for bile formation, thus interindividual differences in expression might lead to differences in susceptibility for acquired cholestasis such as drug-induced cholestasis (DIC).

A possible pathogenetic role of canalicular ABC-transporters for DIC has so far not been investigated. However, there are several lines of evidence that drug interactions with canalicular ABC-transporters might be important for drug-induced cholestasis. Various drugs including cyclosporin A, rifampicin or bosentan inhibit taurocholate uptake in Sf9 cells expressing BSEP. MDR3 deficiency was suggested to play a role for oral contraceptive-induced cholestasis (CIC) since it was observed in nonpregnant women with a family history of intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) and PFIC3. Furthermore, several models indicate that estradiol-17 β -glucuronide inhibits BSEP after it is secreted into bile by MRP2 which may be an additional underlying mechanism of ICP or CIC.

The main aim of the present work was to investigate a possible pathogenetic role of canalicular ABC-transporters in DIC and other forms of acquired cholestasis. We selected 3 candidate genes (i.e. *ABCB11*, *ABCB4* and *ABCC2*) to identify polymorphisms at risk for cholestasis: BSEP and MDR3 are essential for bile formation, since other pathways cannot substitute for their deficiency while MRP2 dysfunction is compensated to a certain degree by other hepatic transporters including MRP3 and MRP4. Nonetheless, MRP2 might play a role in certain forms of cholestasis (e.g. CIC or ICP). Our hypothesis was that low BSEP or MDR3 expression result in decreased bile formation, while higher than normal MRP2 expression could be a risk factor for ICP or CIC. Thus, we initially investigated whether such phenotypes exist in the normal population and then, if these phenotypes are due to polymorphic transport proteins. For this purpose, we analyzed the extent of interindividual expression levels of BSEP, MDR3 and MRP2 in normal liver tissue obtained from 110 patients undergoing partial hepatectomy by Western Blot analysis in relation to frequent nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) (**Chapter 3**). Two major conclusions could be drawn from our results: first, the data indicate that individuals with very low BSEP or MDR3 expression exist in the population, and second, there are SNPs that might be relevant for canalicular ABC-transporter expression (i.e. low BSEP expression was associated with the 1457C-allele (A444) of *ABCB11* 1457T>C (V444A) and high MRP2 expression with *ABCC2* variants 3600A (E1188) and 4581G>A (Y1515)).

The next aim was to show whether these SNPs have a pathogenetic impact for acquired cholestasis (**Chapter 4**). Therefore, we collected blood for DNA isolation from 65 patients suffering from different forms of cholestasis including 19 with DIC, 41 with ICP and 5 with oral CIC. After full gene sequencing for *ABCB11* and *ABCB4*, 3 patients with disease-associated *ABCB11* mutations and 6 with disease-associated *ABCB4* mutations were excluded. In the remaining 55 cholestatic patients, the V444A polymorphism distributed significantly different compared to non-cholestatic controls. The 1457C-allele was significantly more frequent in patients with acquired cholestasis (DIC 71%, ICP 75% and CIC 100%) as compared to Caucasians (57%), women with uneventful pregnancies (51%) and patients with drug-induced hepatocellular liver injury (54%). We were able to show a clear trend of increasing serum bile acids in patients carrying 1457C-alleles as compared to patients with 1457T-alleles, which might be due to decreased BSEP expression. Thus, we conclude that similar to inherited cholestatic syndromes, decreased BSEP expression might be a critical predisposing risk factor in a majority of patients with acquired cholestasis, and that *ABCB11* 1457T>C (V444A) should be considered as a pathogenetic marker for cholestasis. The *ABCC2* 3600A (E1188) and 4581G>A (Y1515) would have the highest pathogenetical impact in patients with ICP and oral CIC. Our genotyping data in ICP and CIC patients however, do not support that the polymorphisms play a role for estrogen-induced cholestasis. The SNPs distributed similarly in patients with ICP and CIC as in women with normal pregnancies and Caucasians.

Overall, we were able to show that polymorphic BSEP expression seems to be a major risk factor for acquired forms of cholestasis and *MDR3* deficiency is most likely associated with mutations in the *ABCB4* gene. The role of *MRP2* for acquired cholestasis remains controversial: deficiency might have an impact for hepatic drug clearance, while high *MRP2* activity may also be important for certain forms of cholestasis.