

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/43419> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Schaap, M.M.

Title: The use of transcriptomics data in detecting non-genotoxic carcinogens

Issue Date: 2016-10-04

Nederlandse samenvatting

Inleiding

Dagelijks komen we in aanraking met chemische stoffen die gebruikt worden voor diverse doeleinden, denk hierbij aan medicijnen, voedingsmiddelen, industrie, etc.. Om veilig gebruik van deze stoffen te kunnen garanderen, is het essentieel dat mogelijke schadelijke effecten op de gezondheid, de 'toxicologische eigenschappen', na blootstelling aan deze stoffen, in kaart gebracht worden. Een van de toxicologische eigenschappen die bepaald moet worden is de potentie van chemicaliën om kanker te induceren. Bij kankerverwekkende stoffen, aangeduid als carcinogenen, wordt onderscheid gemaakt tussen stoffen die direct schade toebrengen aan DNA en stoffen die via andere werkingsmechanismen aanzetten tot carcinogeniteit. Deze stoffen noemen we, respectievelijk, genotoxische carcinogenen en niet-genotoxische carcinogenen. Teststrategieën om deze potentie van chemicaliën te vast te stellen bestaan vaak uit *in vitro* en *in vivo* testen. Een eerste stap in een dergelijke teststrategie is om *in vitro* te bepalen of een stof direct schade toebrengt aan het DNA en dus genotoxisch is. Deze stap geeft echter geen informatie over eventuele carcinogeniteit. Als een stof *in vitro* positief bevonden wordt dan volgt er een kortdurende *in vivo* studie om deze resultaten te bevestigen. Is het resultaat zowel *in vitro* als *in vivo* positief dan is de stof genotoxisch. Zijn de resultaten *in vitro* of *in vivo* negatief dan wordt de stof bestempeld als 'niet-genotoxisch'. Afhankelijk van criteria, zoals onder andere bewijs van frequente of langdurige humane blootstelling, wordt bepaald of er vervolgens langdurige dierstudies uitgevoerd moeten worden om vast te stellen of de stof carcinogeen is.

Bij het het bepalen van de carcinogeniteit van chemische stoffen kunnen twee problemen worden geïdentificeerd. Ten eerste, komt het voor dat stoffen die *in vitro* een positief resultaat geven *in vivo* negatief worden bevonden. Deze stoffen hebben *in vitro* dus een vals-positief resultaat gegeven waardoor er onnodig dierproeven zijn gedaan. Dit is een ethisch probleem omdat onnodig dieren gebruikt worden, maar ook een economisch probleem omdat het tot onnodige uitgaven leidt. Ten tweede, chemicaliën die zowel *in vitro* als *in vivo* een negatief testresultaat geven, worden niet verder getest, terwijl deze stoffen wel degelijk carcinogeen kunnen zijn. De niet-genotoxisch carcinogenen

hebben met elkaar gemeen dat deze niet direct DNA-schade veroorzaken. De werkingsmechanismen van de niet-genotoxische carcinogenen lopen sterk uiteen en dit maakt het erg lastig om deze groep van stoffen in één test systeem te detecteren.

De studies beschreven in het kader van dit proefschrift concentreren zich op het eerste deel van de teststrategie voor carcinogeniteit, namelijk de *in vitro* testen. Aan deze studies liggen twee doelstellingen ten grondslag:

- I) Het verbeteren van *in vitro* testen om genotoxiciteit aan te tonen met de intentie om het aantal vals-positieve test resultaten te reduceren.
- II) De identificatie van niet-genotoxische carcinogenen door middel van een op 'transcriptomics' gebaseerde aanpak om de werkingsmechanismen van deze stoffen te herkennen. 'Transcriptomics' is een technologie waarbij onder andere veranderingen in genexpressie gedetecteerd kunnen worden.

Samenvatting

Hoofdstuk 2 gaat in op de eerste doelstelling van dit proefschrift, het reduceren van vals-positieve testresultaten in *in vitro* testen. In deze studie is onderzocht in welke mate delende muizenlevercellen een geschikt model zijn voor het beantwoorden van deze doelstelling. De eerste stap was het karakteriseren van de cellen op eigenschappen die van belang zijn voor een betrouwbare genotoxiciteitstest. Zo is onder andere aangetoond dat deze primaire cellen na isolatie biotransformatiecapaciteit en p53-functionaliteit hebben behouden. De levercellen, afkomstig van *pUR288 LacZ plasmid-based* transgene muizen, zijn vervolgens blootgesteld aan vier genotoxische stoffen en met behulp van de *lacZ rescue assay* is de mutantfrequentie bepaald. Verkregen resultaten tonen aan dat deze methode geschikt is om DNA-schade te detecteren. Bijkomend voordeel is dat verschillende soorten DNA-schade, *i.e.* genmutaties en chromosomale afwijkingen, detecteerbaar zijn in deze primaire cellen. In een vervolgstudie (data nog niet gepubliceerd) is aangetoond dat stoffen die in andere *in vitro* studies vals-positieve testresultaten geven in dit systeem negatief getest zijn. Echter additionele validatie studies zijn nog nodig om genotoxiciteitstesten met primaire *LacZ* levercellen als robuuste en betrouwbare testen te classificeren.

In **Hoofdstuk 3, 4 en 5** ligt de focus op de tweede doelstelling van dit proefschrift, het herkennen van werkingsmechanismen van niet-genotoxische carcinogenen.

Hierbij is gebruik gemaakt van transcriptomics met als achterliggende gedachte dat de meeste niet-genotoxische carcinogenen een verstorend effect zullen hebben op genexpressie.

In **Hoofdstuk 3** is aangetoond dat chemische stoffen die een vergelijkbaar werkingsmechanisme hebben ook vergelijkbare veranderingen laten zien op genexpressie niveau. Net als in **Hoofdstuk 2** is ook hier gebruik gemaakt van primaire muislevercellen met het verschil dat de cellen in deze studie, gekweekt in een 'sandwich configuratie' tussen twee lagen collageen, niet meer in staat waren tot celdeling. De levercellen zijn blootgesteld aan zestien niet-genotoxisch carcinogenen, bestaande uit acht duo's van stoffen, waarbij elk duo een ander werkingsmechanisme vertegenwoordigd. Er zijn twee methoden toegepast om de teststoffen op basis van hun genexpressieprofielen te categoriseren: een 'supervised' en een 'unsupervised' methode. In de 'supervised' methode worden stoffen op basis van werkingsmechanisme van te voren ingedeeld in duo's. Met behulp van deze methode is bepaald welke set van genen het meest onderscheidend is voor elk duo/paar van stoffen. Deze aanpak heeft veelbelovende resultaten opgeleverd, maar gaat voorbij aan het feit dat stoffen meer dan één werkingsmechanisme kunnen hebben.

Bij de 'unsupervised' methode zijn de meest significant gereguleerde genen van een enkele stof individueel vergeleken met genensets van andere teststoffen. Deze methode zorgt ervoor dat stoffen met een vergelijkbaar werkingsmechanisme en dus ook een vergelijkbaar genexpressieprofiel aan elkaar gelinkt kunnen worden. Voordeel van deze aanpak is dat een stof qua genexpressie niveau vergelijkbaar kan zijn met meer dan één andere stof en dat op deze manier meer dan één werkingsmechanisme opgepikt kan worden.

In vervolg op **Hoofdstuk 3** zijn in **Hoofdstuk 4** de mogelijkheden van de 'unsupervised' methode verder onderzocht. Hiervoor zijn naast niet-genotoxische carcinogenen ook andere stoffen meegenomen, namelijk genotoxische en niet-carcinogene (controle) stoffen. In aanvulling op de levercellen is een additioneel celsysteem meegenomen, embryonale muizenstamcellen. Waar met behulp van de levercellen verscheidene niet-genotoxische carcinogenen op basis van genexpressie goed geclassificeerd konden worden, bleken de stamcellen erg efficiënt als het gaat om het detecteren van genotoxische stoffen. Hiermee is in deze studie aangetoond dat de methode om genensets met elkaar te vergelijken niet gelimiteerd is tot een bepaalde set van stoffen of een bepaald

celsysteem. Dit maakt de 'unsupervised' methode geschikt als testsysteem om risico's van chemische stoffen in kaart te brengen.

Als extra verdiepingsslag is in **Hoofdstuk 5** meer uitgebreid ingegaan op het testen van concentratiereeksen en daarbij ook op de procedure om de blootstellingconcentraties te bepalen. Tot dusver werd elke geselecteerde stof slechts bij één concentratie getest. Het nadeel hiervan is dat, ondanks criteria voor de selectie van de concentraties, dit bij een aantal teststoffen resulteerde in weinig respons op genexpressie niveau, terwijl andere stoffen juist een behoorlijk toxische respons lieten zien. Door een reeks van concentraties te testen wordt de kans om het dominante werkingsmechanisme op te sporen aanzienlijk vergroot. Als voorbeeld werd er een pilot studie uitgevoerd met twee niet-genotoxische carcinogenen stoffen: Cyclosporine A en Tacrolimus. In voorgaande studies waarin slechts één concentratie per stof werd getest vormden deze stoffen geen match, terwijl bij het testen van meerdere concentraties wel overlap werd gevonden op genexpressie niveau. Daarnaast blijkt dat de genensets, die gebruikt worden als input voor de 'unsupervised' methode om genensets te vergelijken, een goede afspiegeling zijn van de routes (pathways) en biologische processen die afgeleid kunnen worden van het complete genexpressie profiel.

Dit proefschrift toont aan dat het gebruik van genexpressiedata een positieve bijdrage levert aan het detecteren van niet-genotoxische carcinogenen. Hoewel de methode om genensets te vergelijken niet specifiek het proces in kaart brengt dat leidt tot carcinogeniteit, het is een belangrijke stap in het detecteren van de werkingsmechanismen van een complexe groep van stoffen. De gebruikte methode is niet gelimiteerd tot niet-genotoxisch carcinogenen, maar is ook geschikt om toe te passen om algemene toxiciteit van chemische stoffen te beoordelen.

