



Briefrapport 340720004/2010
A.S. Kienhuis et al.

Systems biology ter verbreding van de toepasbaarheid van *in vitro* testen in de toxicologie.

RIVM briefrapport 340720004/2010

Systems biology ter verbreding van de toepasbaarheid van *in vitro* testen in de toxicologie

Anne S. Kienhuis, RIVM
Rob J. Vandebriel, RIVM
Jos G.M. Bessems, RIVM
Henk van Loveren, RIVM
Kirsten A. Baken, NUTRIM
Jeroen L.A. Pennings, RIVM
Leo T.M. van der Ven, RIVM

Contact:

Leo T.M. van der Ven
GBO
leo.van.der.ven@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport, in het kader van Project Alternatieven voor Dierproeven

© RIVM 2010

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: 'Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave'.

Inhoud

SAMENVATTING	4
DEFINITIES EN BEGRIPPEN.....	5
TOEPASSING VAN SYSTEMS BIOLOGY IN DE TOXICOLOGIE VAN DE LEVER.....	7
TOEPASSING VAN SYSTEMS BIOLOGY IN DE TOXICOLOGIE VAN HET IMMUUNSYSTEEM.....	9
CONCLUSIES	10

Samenvatting

Toxicogenomics is een nieuwe discipline in de toxicologie, gericht op het in kaart brengen van veranderingen in genexpressie na blootstelling aan een toxisch agens. Samen met andere “omics” methoden zou deze vernieuwing kunnen zorgen voor een verbeterde informatieve waarde van klassieke toxicologische testen, waarmee ook de inzetbaarheid van alternatieve testen vergroot zou kunnen worden. Deze zou vervolgens kunnen bijdragen aan het verminderen van proefdiergebruik.

De toepasbaarheid van moderne moleculaire technieken in de risicoschatting en -beoordeling blijft tot nu toe echter beperkt, omdat veranderde moleculaire profielen onvoldoende in pathologische veranderingen en toxicologische mechanismen verankerd zijn. De ideeën over dit onderwerp hebben zich de laatste jaren met de toenemende mogelijkheden van de moleculaire technieken fors ontwikkeld; en het rapport uit 2007 van de U.S. National Academy of Sciences (NAS) *“Toxicity Testing in the 21st century: A Vision and a Strategy”* leverde hieraan een bijzondere bijdrage. Dit rapport benadrukt het belang van het onderkennen van de samenhang in veranderingen in moleculaire profielen na blootstelling aan een toxisch agens. Deze samenhang is de kern van het denken in de systems biology. In dit briefrapport worden de begrippen uit de systems biology toegelicht en het perspectief samengevat van toepassing in twee onderdisciplines van de toxicologie, te weten de toxicologie van de lever en de toxicologie van het immuunsysteem.

Definities en begrippen

De moderne “omics” technologieën beschrijven moleculaire gebeurtenissen in een biologisch systeem, op het niveau van respectievelijk het transcriptoom (transcriptomics, mRNA genexpressie), het proteoom (proteomics, eiwitexpressie) en het metabooloom (metabolomics, metabolietexpressie). In *systems biology* worden interacties in een intact systeem (een cel, weefsel, orgaan of geheel organisme) bestudeerd door integratie van informatie over expressie van grote hoeveelheden genen, eiwitten en/of metabolieten. Hoewel deze zogenaamde expressieprofielen binnen een systeem zeer dynamisch zijn, kunnen door integratie van momentopnamen de variaties en interacties binnen een systeem onder verschillende condities en in de tijd goed beschreven worden. Op deze manier probeert systems biology de complexiteit van een biologisch systeem te benaderen. *Systems toxicology* is de toepassing van de systems biology benadering in de toxicologie. Zodoende beschrijft systems toxicology de verstoring van elementen binnen een gegeven biologisch systeem onder invloed van een toxische stof of andersoortige stress, met als doel het mechanisme van de toxische respons in kaart te brengen (Waters and Fostel, 2004).

System toxicology maakt zodoende gebruik van dezelfde genomics technologieën als systems biology, die dan bekend staan als *toxicogenomics*. Toxicogenomics kent twee belangrijke toepassingen. De eerste is *predictive toxicogenomics*, waarbij vroege toxicogenomics biomarkers worden gezocht, d.w.z. genen, eiwitten en/of metabolieten die na korte blootstellingsduur en/of lage doseringen van stressors en toxicanten een toxische respons op langere termijn voorspellen. Voor de ontwikkeling van systems toxicology is echter de *mechanistic toxicogenomics* van belang. Expressieprofielen geïnduceerd door toxicanten worden binnen een systeem gemeten op verschillende moleculaire niveaus, verschillende tijdstippen en bij verschillende doseringen om zo het mechanisme van de toxische respons te kunnen beschrijven. Belangrijk is de gecombineerde evaluatie van “omics” data met traditionele toxicologische parameters, de zogenaamde fenotypische verankering, om ook de toxische respons waar de expressieprofielen toe leiden in beeld te brengen (Paules, 2003). Op deze manier kunnen schadelijke effecten van toxicanten onderscheiden worden van homeostatische veranderingen die zorgen voor aanpassing van het systeem aan de verstoorde situatie zonder tot toxiciteit, d.w.z. nadelige gezondheidseffecten, te leiden.

In het bovengenoemde NAS rapport wordt het bijzondere belang van *toxicity pathways* benadrukt. Toxicity pathways worden gedefinieerd als geschakelde moleculaire gebeurtenissen in de cel, die, wanneer ze voldoende verstoord worden, resulteren in negatieve gezondheidseffecten (NRC, 2007). Ook voor toxicity pathways geldt dat de verstoring kan worden waargenomen op de verschillende “omics” niveaus van gen-, eiwit- en metabolietexpressie. In de bioinformatica zijn tools ontwikkeld waarmee moleculaire gebeurtenissen tot toxicity pathways gekoppeld kunnen worden en waarmee de mate van verstoring berekend kan worden, bijvoorbeeld door gebruikmaking van dosisrespons

relaties gericht op specifieke biologische functies zoals celcyclus, lipidetransport, of ijzerbinding.

Het belang van eenmaal geïdentificeerde toxicity pathways voor het mechanisme van de toxische respons kan verder bestudeerd worden door middel van *functional genomics*. Deze nieuwe technieken, waaronder microRNA (miRNA) en RNAi, kunnen specifieke elementen in de toxicity pathway op genexpressie niveau uitschakelen om zo een specifiek beeld te krijgen van de functie van de toxicity pathway in de geïntegreerde toxische respons, oftewel het netwerk van toxicity pathways dat leidt tot het toxische effect (NRC, 2007).

Omdat de integratie van alle typen gegevens leidt tot toegenomen inzicht in een systeem als geheel én omdat blijkt dat toxicity pathways tussen verschillende organismen sterk overeenkomen (Beyer et al., 2007) kan er een zinvolle vertaling gemaakt worden tussen testmodellen en van testmodellen naar de mens.

Toepassing van systems biology in de toxicologie van de lever

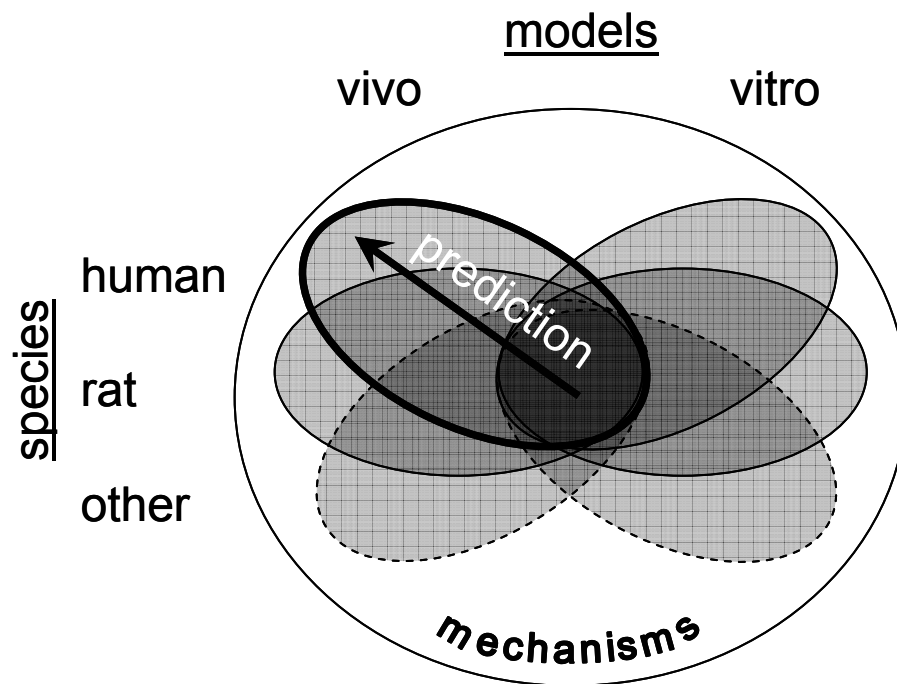
Eén van de meest uitgebreid onderzochte systemen binnen de toxicologie is de lever. Vanwege de positie van de lever tussen het maag-darmkanaal en de systemische circulatie wordt het orgaan blootgesteld aan hoge concentraties toxische stoffen, waarmee het een belangrijk doelwit voor toxiciteit is. Bovendien kan metabole omzetting van stoffen in de lever leiden tot extra activering resulterend in hogere toxiciteit (Jaeschke et al.). Acetaminofen (paracetamol), is een stof waarvan het mechanisme van toxiciteit uitgebreid bestudeerd is door middel van toxicogenomics, en kan om die reden een modelstof voor toxiciteit genoemd worden. De rschade veroorzaakt door de belangrijkste metaboliet van acetaminofen, NAPQI, is necrose (celdood) in de lever (Bessemers and Vermeulen, 2001).

Voor effecten van acetaminofen op de lever zijn m.b.v. “omics” enkele toxicity pathways gedefinieerd in ratten en muizen. De pathways die overeenkomen in deze diersoorten betreffen oxidatieve stress, verstoring van het energiemetabolisme en verstoring van de functie van mitochondriën (Ruepp et al., 2002; Heinloth et al., 2004; Beyer et al., 2007; Wang et al., 2009). Verstoring van deze processen blijkt te zijn gekoppeld aan de necrose, die in de rat en de muis optreedt binnen korte tijd na blootstelling aan een hoge dosis acetaminofen. Uit deze *in vivo* studies blijkt dus dat de toxicity pathways die ten grondslag liggen aan de schadelijke effecten van acetaminofen in de lever sterk vergelijkbaar zijn tussen diersoorten.

De *systems toxicology* benadering kan ook gebruikt worden voor het vertalen van effecten in alternatieve *in vitro* modellen naar *in vivo*. Een belangrijk voordeel van *in vitro* modellen is dat ze gebaseerd kunnen worden op humaan materiaal. Zo kon een grote overeenkomstigheid vastgesteld worden in mechanismen van toxiciteit van acetaminofen tussen levercellen van de rat en de mens *in vitro*, waarbij er bovendien overlap bleek met mechanismen die in de rat *in vivo* werden gevonden. In alle modellen werden telkens oxidatieve stress, verstoring van energiemetabolisme en verstoring van de functie van mitochondriën als belangrijke onderliggende mechanismen van acetaminofen geïnduceerde levertoxiciteit gevonden (Kienhuis et al., 2009).

Het voorbeeld van acetaminofen laat dus zien dat er een onderlinge relevantie is van toxicity pathways binnen *in vitro* modellen en binnen *in vivo* modellen, maar ook tussen *in vitro* en *in vivo* modellen en tussen diersoorten, waaronder de mens. Er blijken echter ook effecten te zijn die specifiek zijn voor een diersoort of die wel in *in vitro* gevonden worden maar niet *in vivo* en andersom (zie Figuur 1). Een inschatting van schadelijke effecten van een stof op de lever van de mens kan dus niet zonder meer afgeleid worden uit één enkel model. Uit grondige vergelijking tussen modellen zal moeten blijken welke pathways essentieel zijn voor het ontstaan van een bepaald fenotype en welke pathways daarmee dus op een voorspellende manier gebruikt kunnen worden voor vertaling van effecten in een *in vitro* model naar de mens. Hoe meer gegevens er beschikbaar zijn uit

verschillende modellen en uit verschillende species, hoe beter specifieke toxicity pathways aan specifieke toxiciteit (fenotype) gekoppeld kunnen worden.



Figuur 1 – Overlap model voor toxicity pathways. Het centrale overlappende gedeelte vertegenwoordigt organisme- en modelonafhankelijke *toxicity pathways* die gebruikt kunnen worden om toxiciteit in de mens te voorspellen. De niet-overlappende gedeeltes representeren effecten (pathways) die specifiek zijn voor het betreffende model. Overlap tussen *in vitro* modellen is niet *per se* representatief voor *in vitro* effecten en overlap binnen één species niet *per se* voor andere species. Hoe groter de verscheidenheid aan organismen en model combinaties, hoe robuuster de toxicity pathways in de centrale overlap geacht kunnen worden voor het voorspellen van specifieke effecten in de mens.

Toepassing van systems biology in de toxicologie van het immuunsysteem

Onder immunotoxiciteit worden de ongewenste effecten van toxische stoffen op het immuunsysteem verstaan. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen directe immunotoxiciteit, waarbij chemische stoffen en geneesmiddelen een direct toxisch effect hebben op het immuunsysteem, en indirecte immunotoxiciteit, waarbij chemische stoffen eerst na binding aan eiwitten in het lichaam als lichaamsvreemd worden herkend en zo een allergische reactie uitlokken. In het geval van huidallergenen ontstaat allergische contactdermatitis, in het geval van luchtwegallergenen (beroeps)astma. In deze notitie beschouwen we enkel indirecte immunotoxiciteit.

Allergenen met een laag molecuulgewicht kunnen onderverdeeld worden in huid- en luchtwegallergenen. Deze twee typen allergenen verschillen niet alleen in de relevante blootstellingroutes, zijnde huid en luchtwegen, maar ook voor wat betreft onderliggende mechanismen en in de bijbehorende risk assessment. De chemische eigenschappen van stoffen die bepalen of een stof een huid- of luchtwegallergeen is worden gaandeweg meer duidelijk. Uit dierstudies, vooral de *local lymph node assay*, was duidelijk dat deze twee typen allergenen een eigen immunologische reactie induceren, de zogenaamde T-helper 1 respectievelijk T-helper 2 responsen. Uit toxicogenomics onderzoek blijkt voorts dat de *oxidatieve stress pathway* vooral aangezet wordt bij blootstelling aan huidallergenen, terwijl luchtwegallergenen vooral de *PTEN (phosphatase and tensin homolog) pathway* aanzetten. Verder blijkt dat de T-helper 1 en T-helper 2 responsen worden aangestuurd door respectievelijk de oxidatieve stress en PTEN pathways.

Voor huidallergie is risk assessment nu al binnen bereik omdat hiervoor gevalideerde proefdiermodellen bestaan, wat niet het geval is voor luchtwegallergie. Voor huidallergie zijn bovendien uit zowel experimenteel proefdieronderzoek als uit *in vitro* onderzoek uitgebreide toxicity pathway databases opgebouwd die het mogelijk moeten maken om direct gebruik te maken van proefdiervrije testen. Organisch chemische analyses en celtesten zouden door middel van computermodellen gecombineerd kunnen worden met fysiologische, klinische en moleculaire gegevens afkomstig van de mens. Voor respiratoire allergie zijn de ontwikkelingen op dit gebied nog niet zo ver, maar moeten wel mogelijk geacht worden.

Conclusies

Integratie van gegevens op het niveau van moleculaire veranderingen en van waarneembare toxicologische veranderingen (fenotype) leidt tot toegenomen kennis van het systeem als geheel, waarbij een systeem kan bestaan uit een cel, een orgaan of een intact organisme. Mechanismen die aan toxische fenotypische veranderingen ten grondslag liggen kunnen beschreven worden als toxicity pathways. Er blijken sterke overeenkomsten te zijn in toxicity pathways tussen verschillende organismen en per organisme tussen verschillende testmodellen. Goede kennis over deze systemen maakt een zinvolle vertaling mogelijk tussen testmodellen en van testmodellen naar de mens. Dit principe blijkt toegepast te kunnen worden op het voorbeeld van levertoxiciteit die veroorzaakt wordt door acetaminofen. Ook in het voorbeeld van luchtwegallergie lijkt de verwachting gerechtvaardigd dat systems toxicology kan bijdragen aan verbetering van de risk assessment.

De twee besproken voorbeelden geven aan dat het perspectief reëel is dat de systeembenadering in de toxicologie als geheel (systems toxicology) een grote bijdrage kan leveren aan het vertalen van resultaten uit proefdiervrije testmethoden naar de mens en zodoende aan de proefdiervrije risk assessment van stoffen voor de mens.

Een sterke inzet op vergelijkend toxicogenomics onderzoek tussen modellen en het identificeren van ontbrekende gegevens voor het maken van voldoende overlap tussen modellen zal de robuustheid van proefdiervrije toxicologisch testen bevorderen.

Het deel over systems biology in de toxicologie van de lever wordt verwerkt tot een wetenschappelijke opinie in een internationaal toxicologisch tijdschrift onder de titel: Hepatic systems toxicology and risk assessment. Kienhuis AS, Pennings JLA, Bessems JG, Driessen M, van der Ven LTM.

Het deel over system biology in de immunotoxicologie zal in 2011 verschijnen als Chapter 13, Immunotoxicogenomics: a systems approach. Vandebriel RJ, van Loveren H, Baken KA, and Pennings JLA; in: Handbook of Systems Toxicology (Sahu SC & Casciano DA, Eds). John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.

Referenties

- Bessems JG and Vermeulen NP (2001). Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol* 31, 55-138.
- Beyer RP, Fry RC, Lasarev MR, McConnachie LA, Meira LB, Palmer VS, Powell CL, Ross PK, Bammler TK, Bradford BU, Cranson AB, Cunningham ML, Fannin RD, Higgins GM, Hurban P, Kayton RJ, Kerr KF, Kosyk O, Lobenhofer EK, Sieber SO, Vliet PA, Weis BK, Wolfinger R, Woods CG, Freedman JH, Linney E, Kaufmann WK, Kavanagh TJ, Paules RS, Rusyn I, Samson LD, Spencer PS, Suk W, Tennant RJ and Zarbl H (2007). Multicenter study of acetaminophen hepatotoxicity reveals the importance of biological endpoints in genomic analyses. *Toxicol Sci* 99, 326-337.
- Heinloth AN, Irwin RD, Boorman GA, Nettesheim P, Fannin RD, Sieber SO, Snell ML, Tucker CJ, Li L, Travlos GS, Vansant G, Blackshear PE, Tennant RW, Cunningham ML and Paules RS (2004). Gene expression profiling of rat livers reveals indicators of potential adverse effects. *Toxicol Sci* 80, 193-202.
- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D and Lemasters JJ (2002). Mechanisms of hepatotoxicity.
- Kienhuis AS, van de Poll MC, Wortelboer H, van Herwijnen M, Gottschalk R, Dejong CH, Boorsma A, Paules RS, Kleinjans JC, Stierum RH, and van Delft JH (2009). Parallelogram approach using rat-human in vitro and rat in vivo toxicogenomics predicts acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans. *Toxicol Sci* 107, 544-552.
- NRC (National Research Council) (2007). *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and A Strategy*. (N. A. Press, Ed.), Washington, DC.
- Paules R (2003). Phenotypic anchoring: linking cause and effect. *Environ. Health Perspect.* 111, A338-A339.
- Ruepp SU, Tonge RP, Shaw J, Wallis N and Pognan F (2002). Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. *Toxicol Sci* 65, 135-150.
- Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE and Galas DJ (2009). Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4402-4407.
- Waters MD and Fostel JM (2004). Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nat Rev Genet* 5, 936-948.

