

In vitro methoden bij genotoxiciteit

L. Verschaeve

GENETISCHE EFFECTEN

⇒ genotoxiciteit



- ERFELIJKE
AANDOENINGEN

- KANKER

- Initiatie
- Promotie
- Conversie
- progressie

Proc. Nat. Acad. Sci. USA

Vol. 70, No. 8, pp. 2281-2285, August 1973

Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection

(frameshift mutagens/aflatoxin/benzo(a)pyrene/acetylaminofluorene)

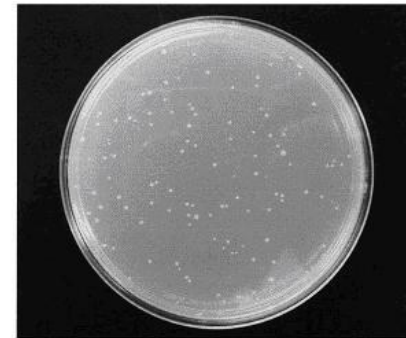
BRUCE N. AMES, WILLIAM E. DURSTON, EDITH YAMASAKI, AND FRANK D. LEE

Biochemistry Department, University of California, Berkeley, Calif. 94720

Contributed by Bruce N. Ames, May 14, 1973

In vitro genotoxiciteit tests

- Bacteria, gisten, ...
- Zoogdier/humane cellen



Control



Dose 1



Dose 2

Studie van de effecten op het genetisch materiaal (DNA): kanker en erfelijke aandoeningen

Gen mutaties

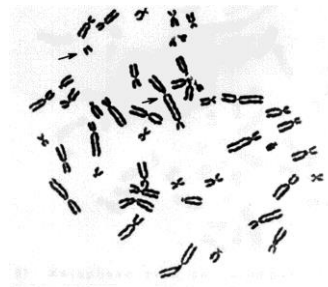
Chromosoom mutaties

Genoom mutaties

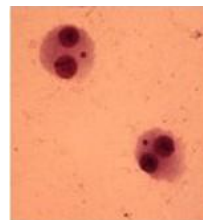
DNA schade & hestel



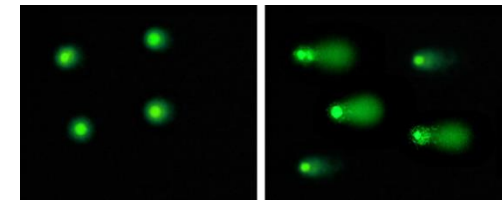
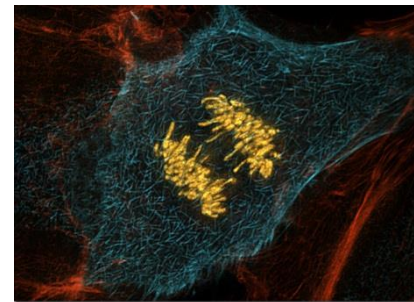
Ames test (Salmonella t.)
Muis lymphoma test



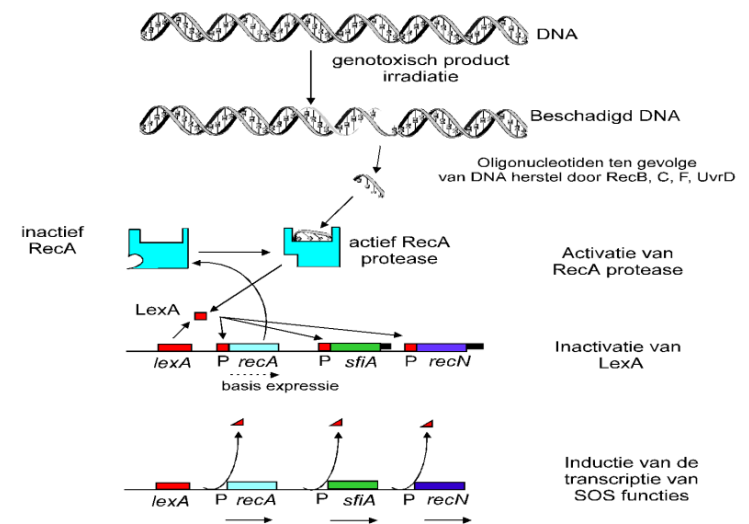
Chromosoom
aberratie test



Micronucleus test



Komeet test



+ *in vitro* toxiciteit tests (NRU, ...)

Tests die op inductie zijn gebaseerd : Vitotox, Umu-C,

...

in vitro tests

Gen mutaties

Chromosomale afwijkingen

Ames test

Hprt test

or

MLA

MN_{vitro} test

or

CA_{vitro} test



positive

positive



in vivo tests

UDS test

TGR GM test

comet assay

MN_{vivo} test

CA_{vivo} test



positive

Carcinogeniciteit test

in vitro tests

Gen mutations

Chromosoom aberraties

Ames test

Hprt test

or

MLA

MN_{vitro} test

or

CA_{vitro} test



positief



positief

~~*in vivo* tests~~

~~UDS test~~

~~TGR GM test~~

~~Comet assay~~

~~MN_{vivo} test~~

~~CA_{vivo} test~~



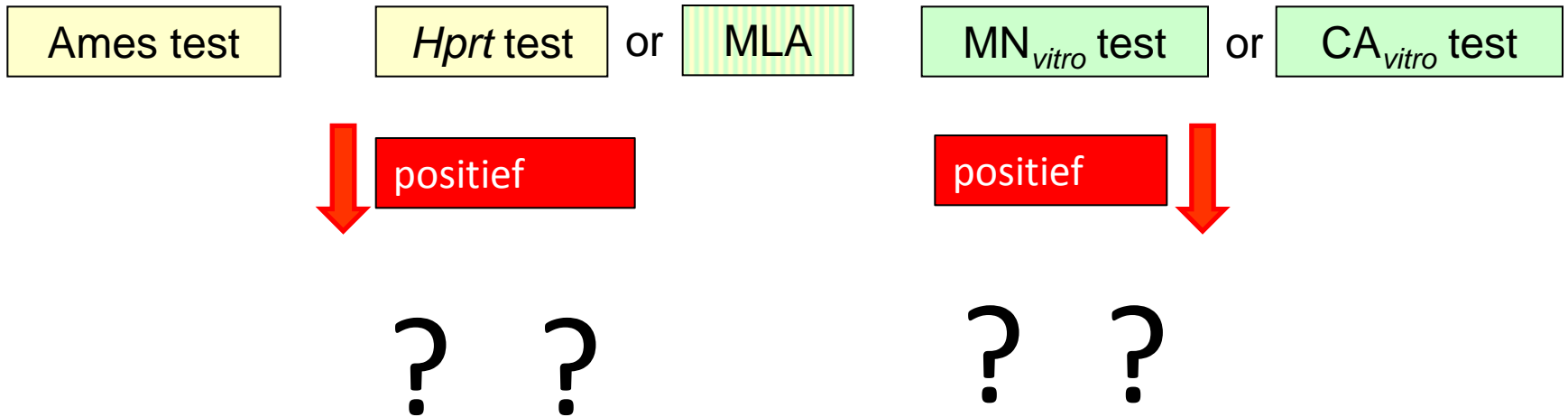
~~positive~~

~~Carcinogenicity test~~

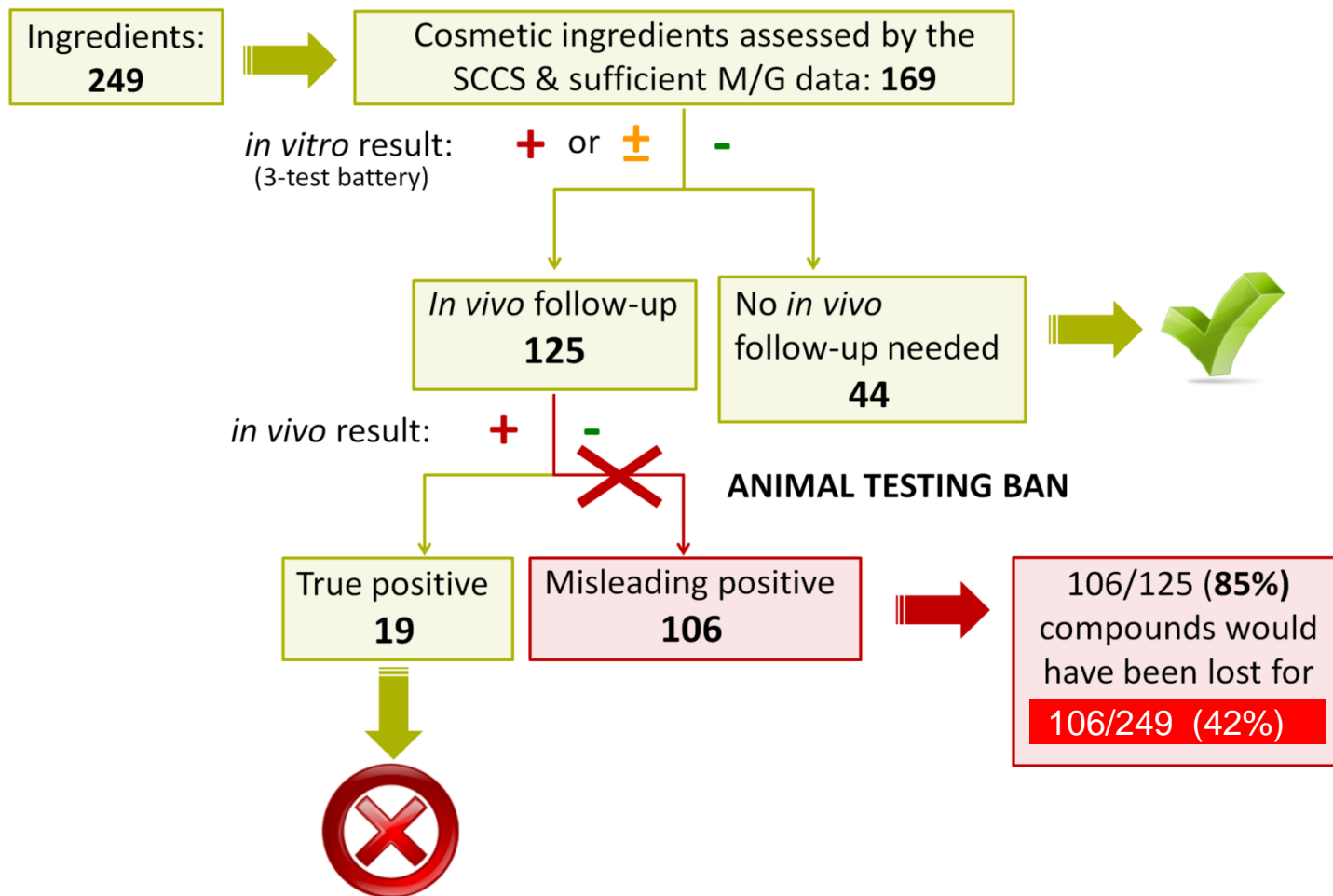
in vitro tests

Gen mutaties

Chromosoom aberraties



Toch moeten we nog altijd beslissen of het agens genotoxisch en/of carcinogeen is of kan zijn



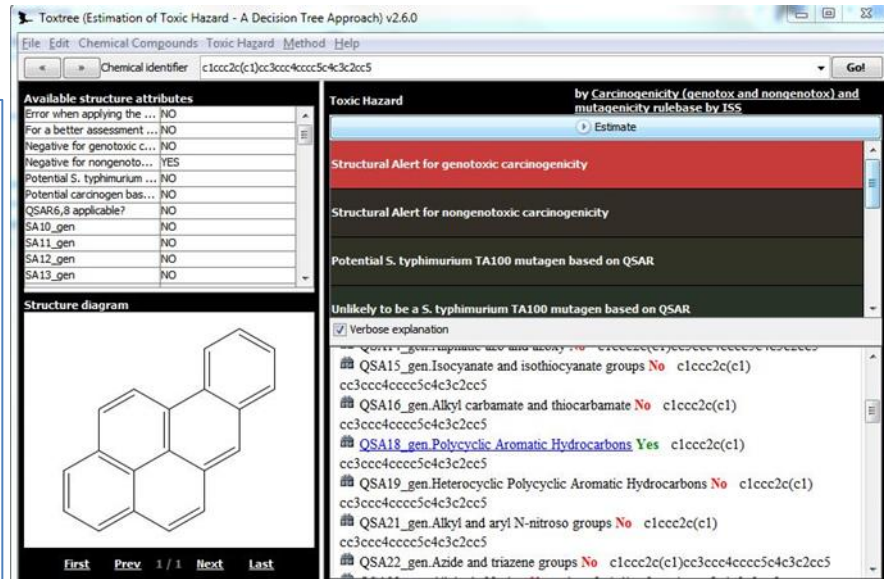
ALTERNATIEVE TEST METHODEN?

- 1) Quantitative structure-activity relationship (meestal afgekort tot QSAR) gebruik van *in silico* methoden (Toxtree, Derek, ...)

Het principe is dat componenten met vergelijkbare structuren ook soortgelijke biologische eigenschappen en werkingsmechanismen moeten hebben. Daarom moet de voorspelling van fysisch-chemische en biologische (bv. genotoxische en antigenotoxische) eigenschappen van moleculen op basis van hun chemische structuur mogelijk zijn.

**Maar de chemische structuur
Moet gekend zijn !**

...De meeste van de commerciële of gratis beschikbare in silico software programma's zijn in staat om vooral bacteriële (Ames test) mutageniciteit te voorspellen



The screenshot shows the Toxtree software interface. The title bar reads "Toxtree (Estimation of Toxic Hazard - A Decision Tree Approach) v2.6.0". The main window is divided into several panes. On the left, there is a table of "Available structure attributes" with columns for the attribute name and its value (YES/NO). Below this is a "Structure diagram" showing a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) structure. On the right, the "Toxic Hazard" pane displays a list of alerts. The first alert is "Structural Alert for genotoxic carcinogenicity" (highlighted in red). Other alerts include "Structural Alert for nongenotoxic carcinogenicity", "Potential S. typhimurium TA100 mutagen based on QSAR", and "Unlikely to be a S. typhimurium TA100 mutagen based on QSAR". A "Verbose explanation" pane at the bottom lists specific QSAR rules with their results (Yes/No) and associated SMILES strings.

Available structure attributes	
Error when applying the ...	NO
For a better assessment ...	NO
Negative for genotoxic c...	NO
Negative for nongenoto...	YES
Potential S. typhimurium ...	NO
Potential carcinogen bas...	NO
QSAR6,8 applicable?	NO
SA10_gen	NO
SA11_gen	NO
SA12_gen	NO
SA13_gen	NO

Toxic Hazard
by Carcinogenicity (genotox and nongenotox) and mutagenicity rulebase by ISS

Estimate

- Structural Alert for genotoxic carcinogenicity
- Structural Alert for nongenotoxic carcinogenicity
- Potential S. typhimurium TA100 mutagen based on QSAR
- Unlikely to be a S. typhimurium TA100 mutagen based on QSAR

Verbose explanation

- QSA15_gen.Isocyanate and isothiocyanate groups No c1ccc2c(c1)cc3ccc4cccc5c4c3c2cc5
- QSA16_gen.Alkyl carbamate and thiocarbamate No c1ccc2c(c1)cc3ccc4cccc5c4c3c2cc5
- QSA18_gen.Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Yes c1ccc2c(c1)cc3ccc4cccc5c4c3c2cc5
- QSA19_gen.Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons No c1ccc2c(c1)cc3ccc4cccc5c4c3c2cc5
- QSA21_gen.Alkyl and aryl N-nitroso groups No c1ccc2c(c1)cc3ccc4cccc5c4c3c2cc5
- QSA22_gen.Azide and triazene groups No c1ccc2c(c1)cc3ccc4cccc5c4c3c2cc5

ALTERNATIEVE TEST METHODEN?

2)

In vitro micronucleus test in 3D humane gereconstrueerde huid modellen
In vitro komeetttest in 3D humane gereconstrueerde huid modellen

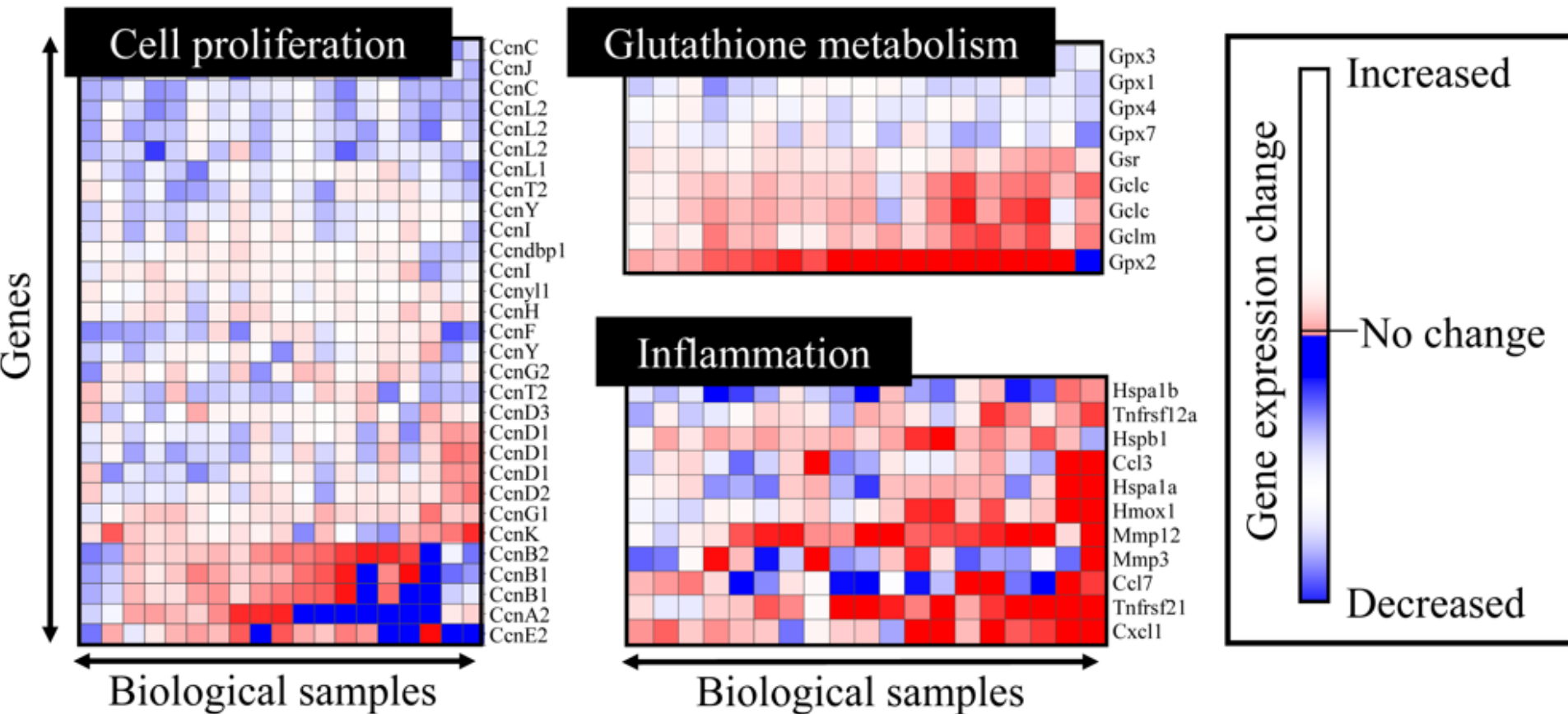
Een 'normale' 2D celkweek is kunstmatig en niet te vergelijken met de reële in vivo toestand

3D reconstrueerde humane huidmodellen zijn een beter alternatief

- **Maakt meer natuurlijke cel-cel en cel-matrix interacties mogelijk**
- **Vertonen een 'in vivo like' gedrag m.b.t. belangrijke parameters zoals levensvatbaarheid van cellen, proliferatie, differentiatie, morfologie, expressie van genen en eiwitten, functies, ...**
- **Blootstellingskinetiek en metabolisme zijn vergelijkbaar met deze van de menselijke huid**
- **Kunnen de kloof helpen overbruggen tussen in vitro en in vivo in termen van kwantitatieve risicobeoordeling (i.h.b. voor blootstellingen via de huid)**
- **Potentieel om als "2e fase" -test te dienen als follow-up voor in vitro positieve**

ALTERNATIEVE TEST METHODEN?

3. Toxicogenomics



Toxicogenomics is een sensationele nieuwe techniek om werkingsmechanismen aan te tonen, zeker als er duidelijke vragen zijn.

Maar men neemt momenteel aan dat de rol als alternatief voor 'klassieke' genotoxiciteitstests nog beperkt is

- Dit geeft indicaties, geen 'zekerheden'
- Vooralsnog geen meerwaarde boven de klassieke in vitro tests
Toxicogenomics toont een adaptieve response t.o.v. blootstelling
- Er zijn nog geen standaard protocols beschikbaar
- Betreffende genotoxiciteit zoekt men uiteraard specifiek naar biomerkers voor genotoxiciteit!
 - **Die moeten nog gevalideerd worden en het is niet altijd duidelijk hoe dat moet gebeuren**
 - ...



GENOMARK: Human genomic biomarker RTqPCR array for optimized and mechanistically-based genotoxicity assessment

Main contributors VUB:

Dr. Gamze Ates
Prof. Vera Rogiers

Main contributors WIV-ISP:

Dr. Tatyana Doktorova
Dr. Birgit Mertens



In het GENOMARK project heeft men op basis van transcriptomicsexperimenten een set van genen geïdentificeerd die worden geactiveerd bij blootstelling aan een genotoxische component. Op basis van deze genenset werd een zogenaamde RTqPCR array ontwikkeld. De RTqPCR zou toelaten om op een eenvoudige, relatief goedkope en snelle manier de wetenschappelijke interpretatie van positieve resultaten afkomstig van in vitro genotoxiciteitstesten te verbeteren.

- Genotoxische agentia kunnen geïdentificeerd worden
- Een beperkt aantal genen kan gebruikt worden
- De geselecteerde genen zijn biologisch relevant

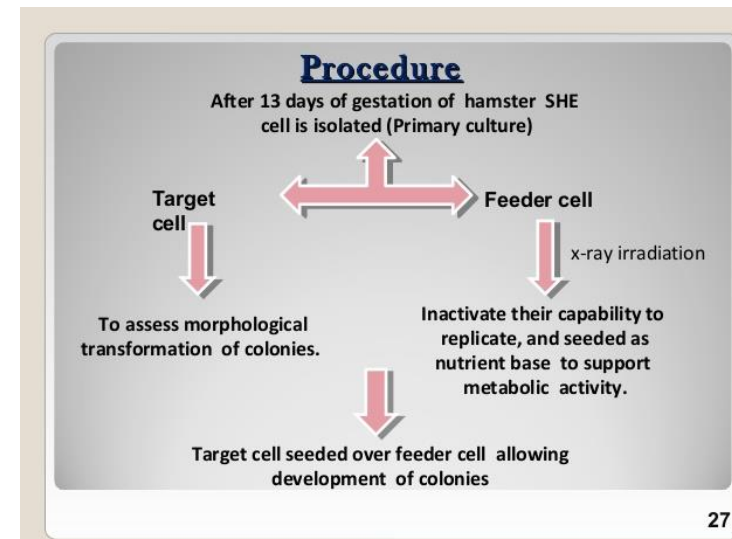
ALTERNATIEVE TEST METHODEN?

4. “cell transformation assays”, SHE assay

Syrian Hamster Embryo (SHE) cell transformation assay: voorspeller van carcinogene producten

SHE cellen zijn normale diploïde, metabole en p53-competente primaire cellen, die het vermogen behouden om xenobiotica te biotransformeren. Blootstelling aan kankerverwekkende chemicaliën leidt tot een toename van morfologisch getransformeerde (MT)-kolonies, die gekenmerkt worden door ongeorganiseerde groeipatronen en beschouwd worden als een vroege fase in het kankerverwekkende proces.

Er is aangetoond dat SHE-cellen morfologisch kunnen worden getransformeerd door behandeling met genotoxische en niet-genotoxische carcinogenen.



Opmerkingen:

- De SHE celtransformatietest zou genotoxische en niet-genotoxische carcinogenen herkennen.
- De SHE celtransformatietest meet celtransformatie maar niet genotoxiciteit.
- De SHE celtransformatietest is een indicator test
 - Een positief resultaat wijst op een iets grotere kans dat de stof een genotoxisch en kankerverwekkend potentieel heeft
 - Een negatief resultaat wijst erop dat de kans op genotoxiciteit of carcinogeniciteit gering(er) is
 - Het is geen genotoxiciteitstest als zodanig
 - De test is vrij tijdrovend

BESLUIT:

Huidige *In vitro* methoden zijn waardevol, maar zijn vooral voorspellend voor niet-genotoxiciteit (negatief resultaat van een test)

Er wordt een relatief groot aantal valse positieve resultaten verwacht. Daarom is er nood aan alternatieve methoden die *in vivo* genotoxiciteit beter kunnen voorspellen

Momenteel worden verschillende opties onderzocht, maar tot nu toe zijn er nog geen alternatieven volledig aanvaard of gevalideerd