

Risiken erkennen – Gesundheit schützen

Toxicogenomics – Anwendungen und Perspektive in der regulatorischen Toxikologie

A. Oberemm¹, K. Paal², K.-E. Appel²

H.-B. Richter-Reichhelm¹, U. Gundert-Remy¹

¹ Sicherheit von Stoffen und Zubereitungen

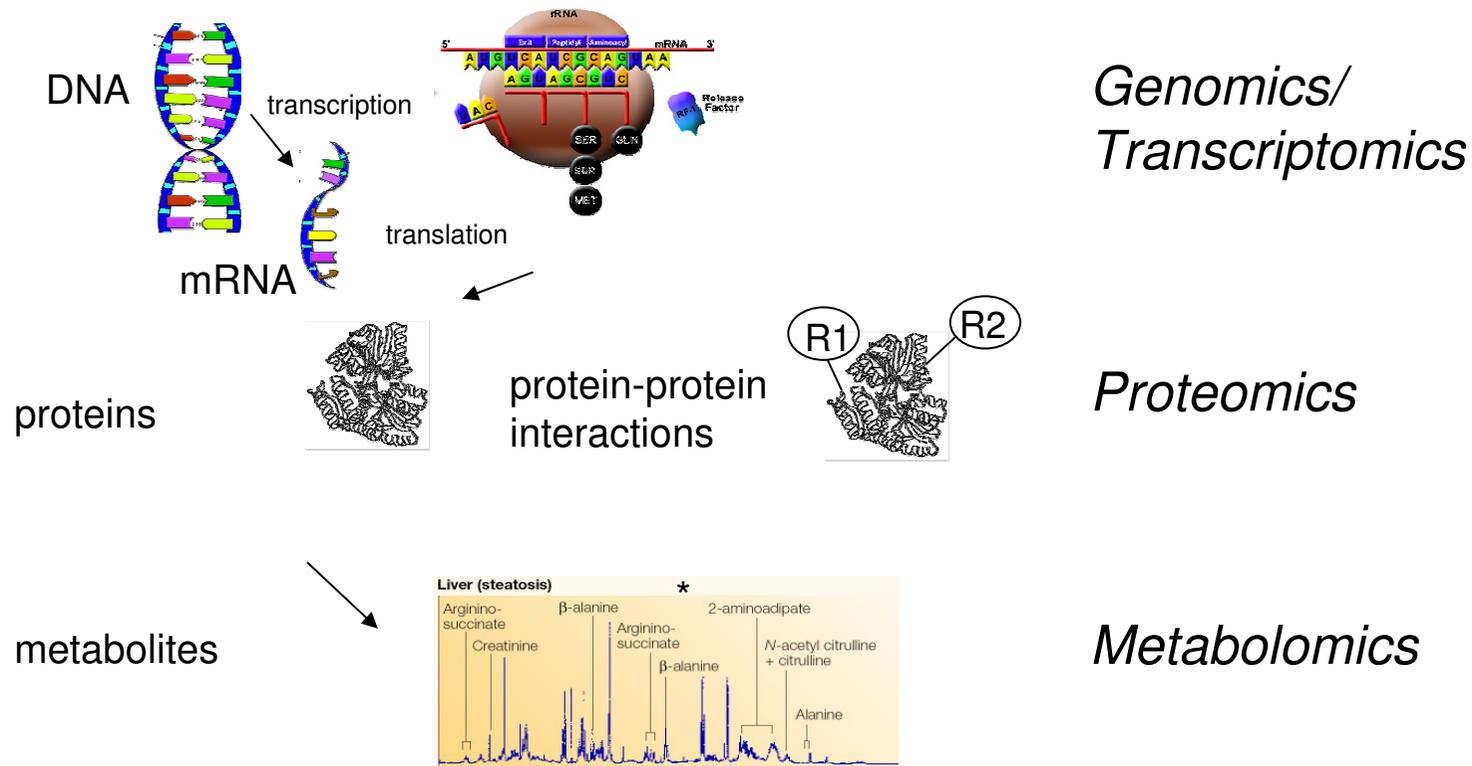
² Zentrum für Experimentelle Toxikologie



Toxicogenomics (TXG)

- umfassende (globale) Analyse der Expression von Genen und Proteinen sowie von Metaboliten nach Exposition mit chemischen Fremdstoffen

Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, et al.
 Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics
 MOLECULAR CARCINOGENESIS 24 (3): 153-159 MAR 1999



* figure from Nicholson et al. 2002

Toxicogenomics & Co

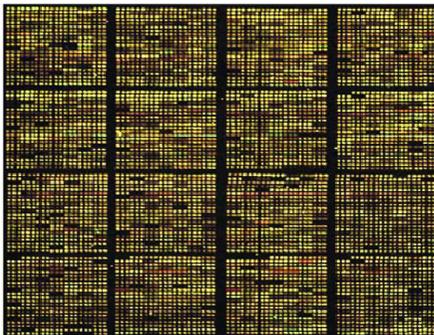
- *OMICS – Methoden; Teildisziplin der Molekularen Toxikologie*
- analog: Pharmacogenomics (pharmazeutische Stoffe)
- **Toxico - / Pharmaco - genetics:**
umfassende Analyse genetischer Polymorphismen (SNP's):
Erfassung individueller Empfindlichkeiten, „personalized medicine“
- **Toxicoproteomics:** umfassende Analyse der Proteinexpression
nach Fremdstoffexposition

Toxicogenomics- Methoden (I)

■ umfassende quantitative Erfassungen der:

✓ Genexpression
Genomics/ Transcriptomics

● Genchips/ DNA-Microarrays

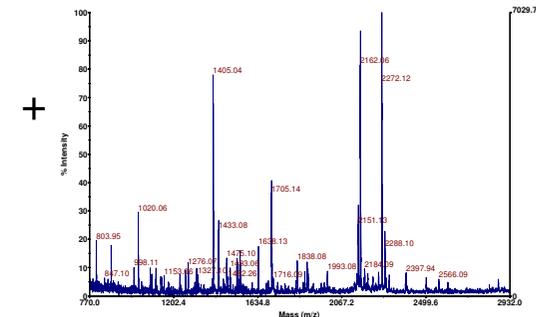
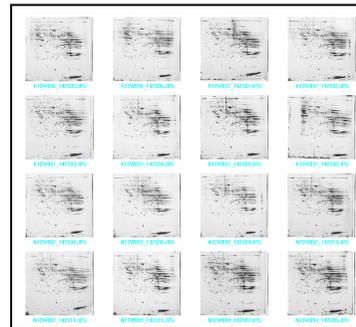


✓ monochrom vs. dual-channel

✓ “Komplett” - Genom vs. selektive Auswahl relevanter Gene

✓ Proteinexpression
Toxicoproteomics

● 2-D (Gel)Elektrophorese (2-DE)
+ massenspektrometrische
Proteinidentifizierung (MALDI-MS)



● nicht-Gel basierte Verfahren
z.B. ICAT-MS¹, SELDI², Protein-Arrays

¹ Isotope-Coded Affinity Tag

² Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization

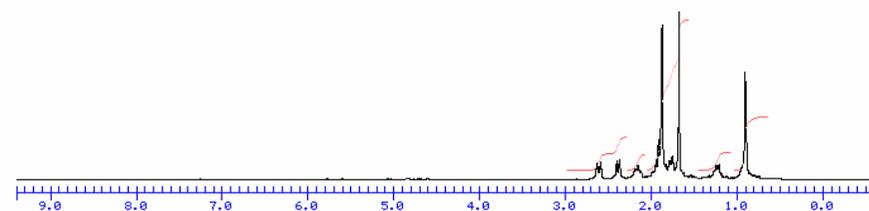
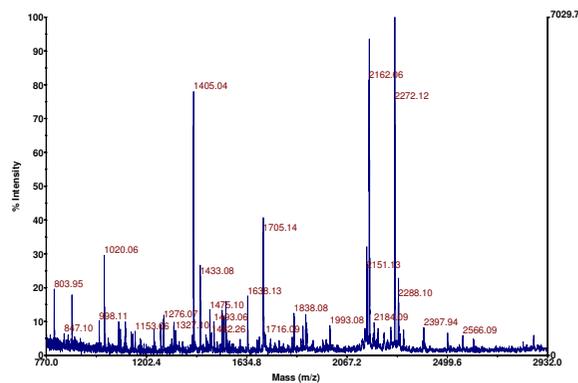
Toxicogenomics- Methoden (II)

- umfassende quantitative Erfassungen der:
 - ✓ Metabolite: *Metabolomics/ Metabonomics* (weitgehend synonym)

- GC-MS

- HPLC-MS

- $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

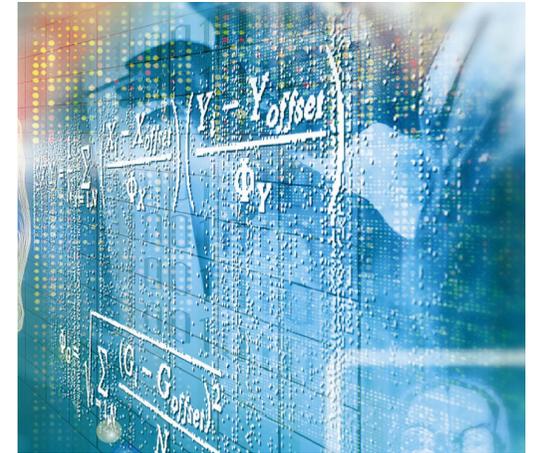


Toxicogenomics- Methoden (III): Bioinformatik

- Methoden zur Datenanalyse

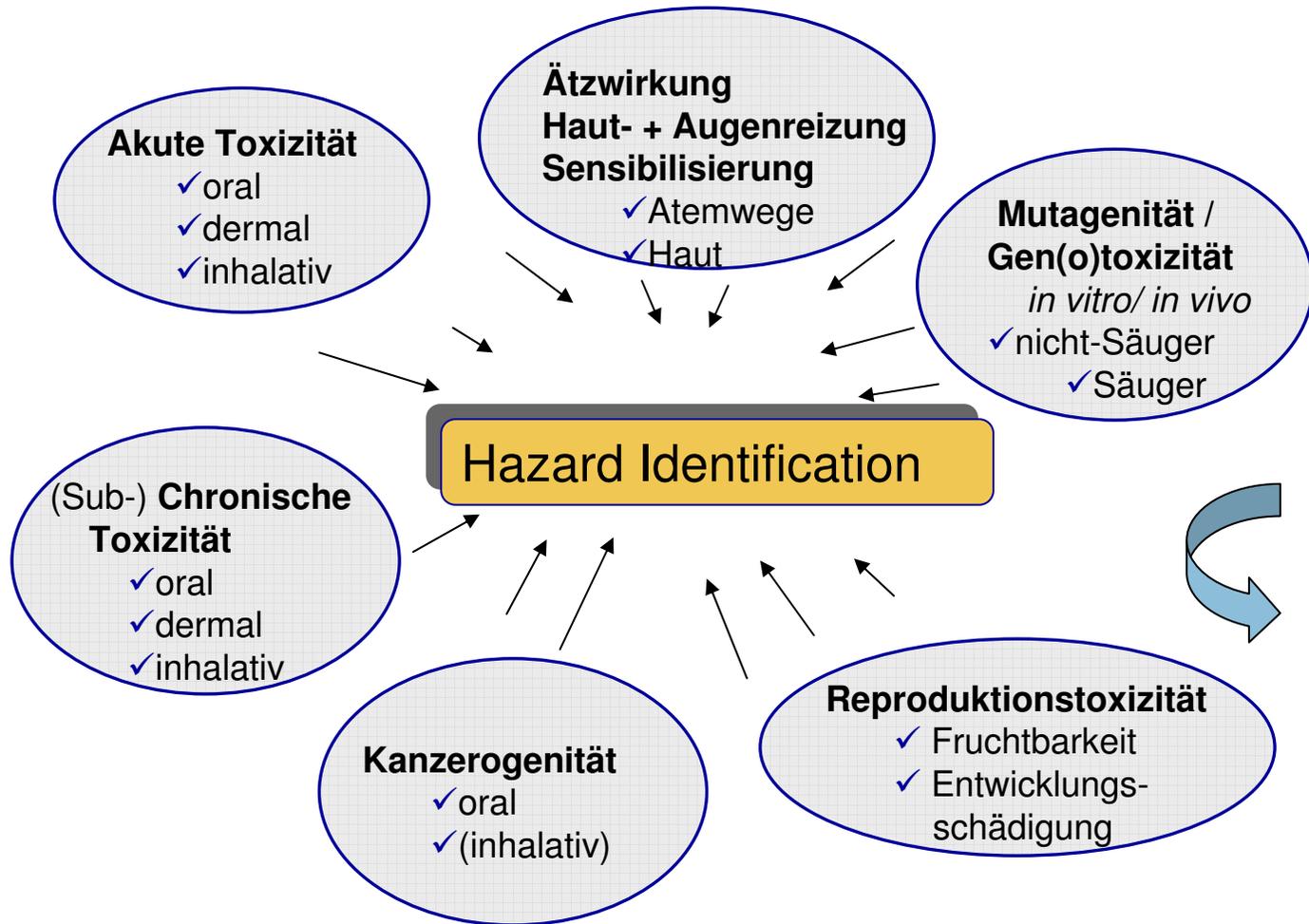
- Biostatistik zur Auswertung von Expressionsrohdaten:
 - *Proben aus unbehandelter Kontrolle vs. Proben aus Behandlungsgruppen*
 - Gen- / Proteinlisten von Identitäten,
welche *expositionsabhängig* dereguliert sind

- Interpretation der Ergebnisse u.a. durch Datenbank-gestützte Analysen:
 - ✓ Gen-/ Proteinfunktion
 - ✓ Zuordnung zu funktionalen Kategorien
Zellstoffwechsel, Pathwayanalysen, Netzwerke
 - ✓ Relevanz für Toxikologie



•image from Nature Vol.424, August 2003, p.611

Endpunkte Toxikologie¹



- LD₅₀
- LOAEL
- NOAEL
- pos. / neg.
- Pathologie
- Histopathologie
- Physiologie

„black box“

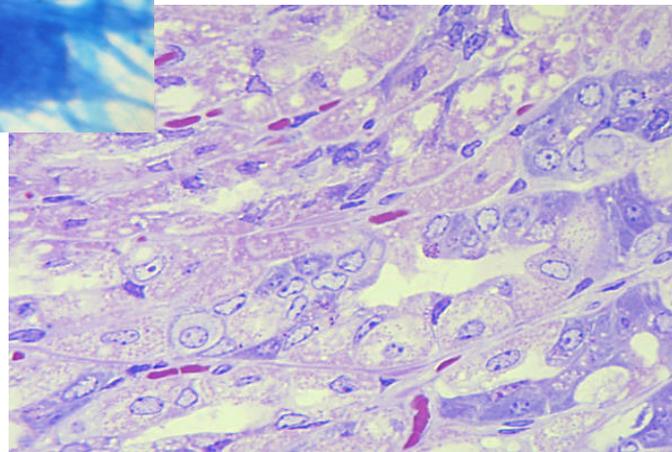
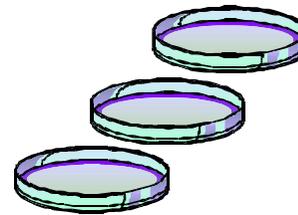
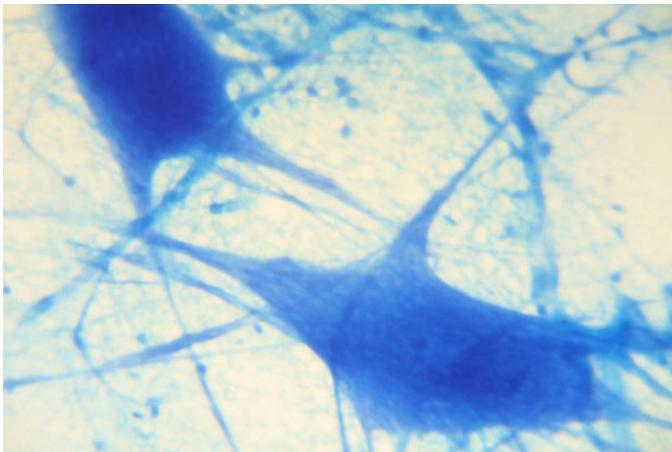


hoher Bedarf an Tierstudien:

- Ethik
- Kosten
- Zeit

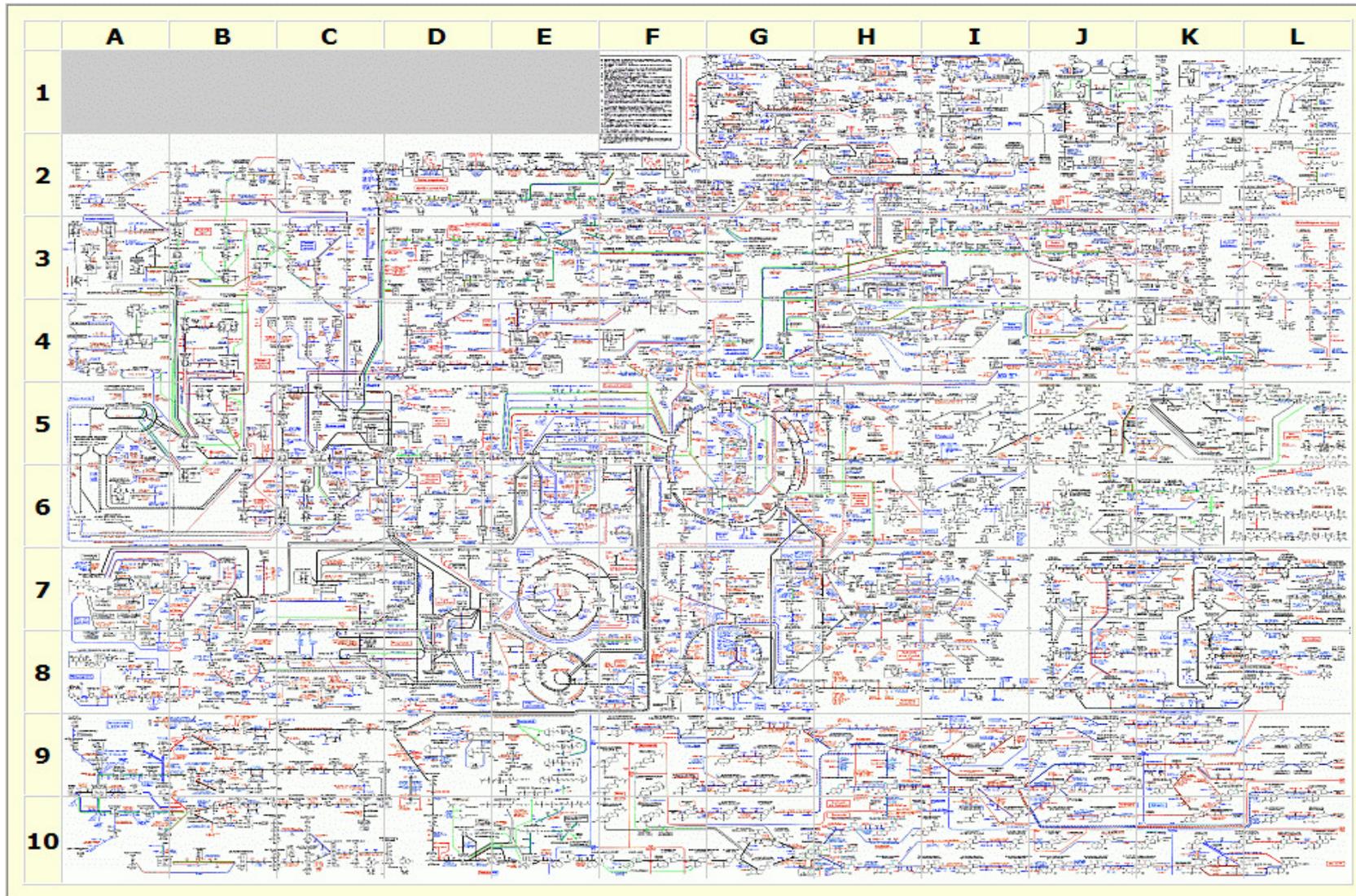
¹ “hazard identification”
 human health- related
 chemicals/ biocides

Antworten Toxicogenomics: Zellen/ Gewebe



Zellstoffwechsel

Roche Applied Science "Biochemical Pathways" wall chart:
http://www.expasy.ch/cgi-bin/show_thumbnails.pl?2



Endpunkte Toxicogenomics

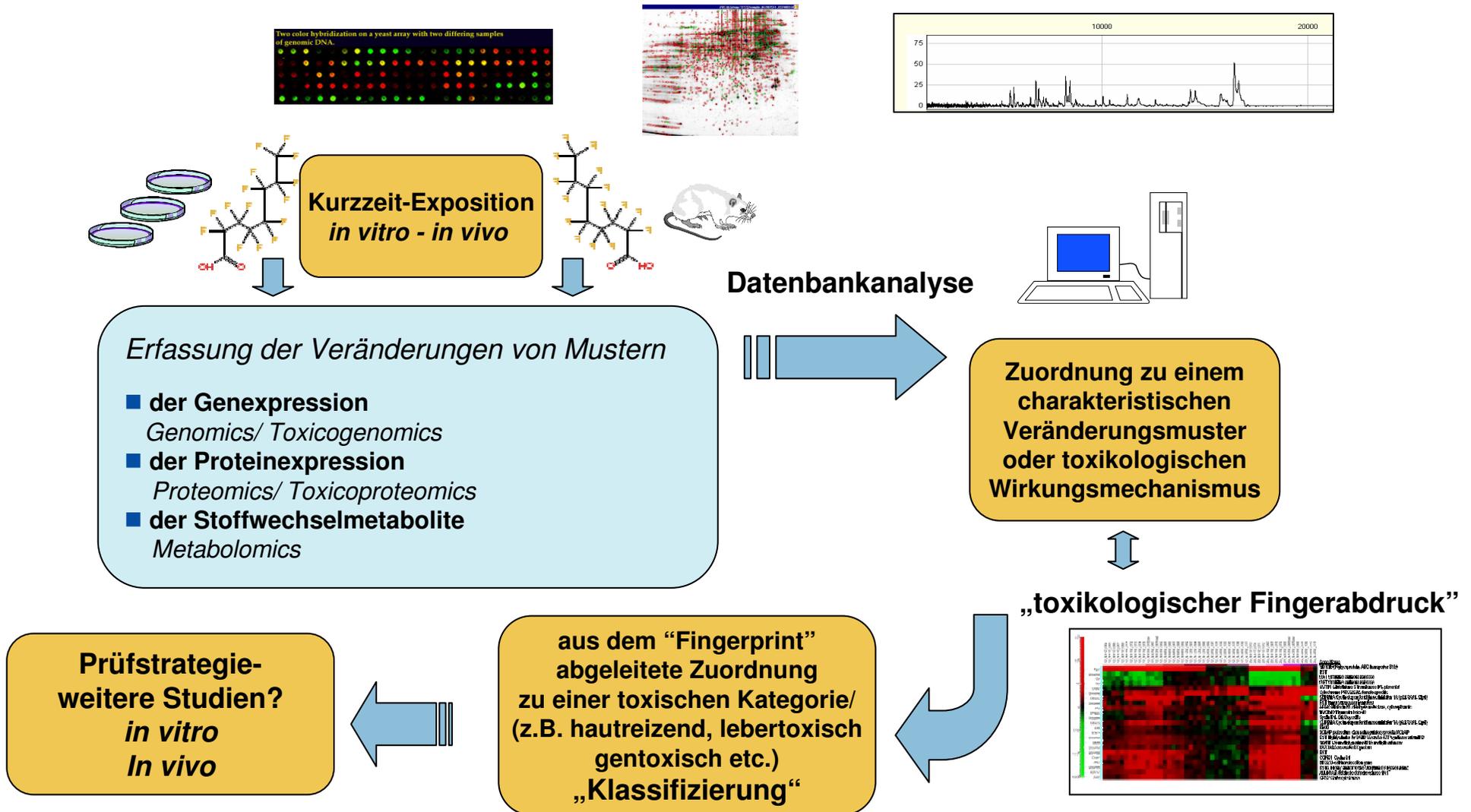
Biochemie der Zelle: Schutz vor durch exogene Faktoren verursachten zelluläre Schäden:

- Reparaturmechanismen (z.B. Reparatur von DNA-Schäden, Proteinstrukturen)
- Aktivierung fremdstoffmetabolisierender Enzyme
- Rezeptoraktivierung (z.B. Östrogenrezeptor)
- Signaltransduktion: Kaskaden biochemischer Veränderungen
- Störung der Homöostase bis hin zur Entstehung irreversibler Veränderungen



Analyse/ Aufklärung toxischer Wirkungsmechanismen

Allgemeine Konzeption



Einsatz von Omics-Methoden in der Toxikologie

Anwendungen

- Einsatz in Kurzzeitassays, um schneller (als mit herkömmlichen Verfahren) grundlegende Informationen zu inhärenten toxischen Eigenschaften von Stoffen zu bekommen (*Screeningverfahren*) :

z.B. *✓ von Stoffen/ Wirkstoffen bei der Produktentwicklung*
✓ von HPV-Altstoffen, von Stoffen unter REACH („priority setting“)

Potentiale

- Identifizierung von Biomarkern (Rückschlüsse auf Exposition und Effekte)
- Aufklärung toxikologischer Wirkungsmechanismen
- Erhöhung des Prädiktionwertes von tierexperimentellen Daten:
 - *mittels mechanistischer Daten kann abgeleitet werden, ob Befunde aus Tierversuchen für den Menschen relevant sind*
- Verbesserung der Aussagefähigkeit/ Relevanz von *in vitro* Methoden
- direkte und indirekte Einsparung von Tierversuchen

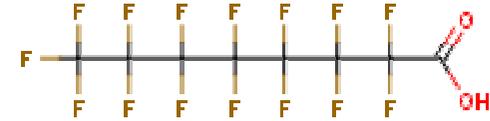
Vision

- komplementärer Einsatz von in silico Methoden (QSAR) und *Omics* Methoden zur Modellierung/ Prädiktion toxischer Effekte von Stoffen

Voraussetzungen

- öffentlich zugängliche Datenbanken
- zentral koordinierte internationale Aktivitäten (Industrie & wiss. Einrichtungen)

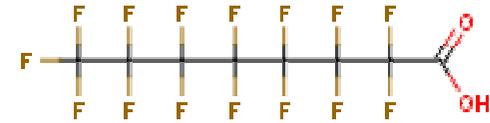
Fallbeispiel: Perfluorooctansäure (PFOA)



- verwendet zur Herstellung von Polymeren
 - ✓ Teflon
 - ✓ Fluortelomeralkohole (FTOH), zur Beschichtung von Kleidung, Möbeln, Lebensmittelverpackungen
- Exposition des Menschen und der Umwelt (weltweit nachgewiesen)
- Daten aus Tierversuchen:
 - ✓ potentiell reproduktionstoxisch + kanzerogen
- keine eindeutigen Ergebnisse über solche Effekte beim Menschen
- Probleme bei der Risikobewertung:
 - Übertragbarkeit der Tierversuchsdaten auf den Menschen
- Effekte im Tier werden auf einen Wirkungsmechanismus zurückgeführt, der für den Menschen kaum relevant ist:
 - ⇒ durch den Rezeptor PPAR α - ausgelöste Peroxisomenproliferation

Perfluorooctansäure (PFOA) (II)

aber:



- Reprotox Studien an PPAR α - knock-out Mäusen und Genexpressionsanalysen mit PFOA- exponierten Maus-Feten (Lungen - + Lebergewebe)
- auch Effekte, die durch andere PPAR-Rezeptoren + andere Faktoren verursacht wurden
- Humanrelevanz der Tierdaten muss weiter untersucht werden!

Takacs ML, Abbott BD

Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (alpha, beta/delta, gamma) by perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate
TOXICOLOGICAL SCIENCES 95 (1): 108-117 JAN 2007

Abbott BD, Wolf CJ, Schmid JE, et al.

Perfluorooctanoic acid-induced developmental toxicity in the mouse is dependent on expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha
TOXICOLOGICAL SCIENCES 98 (2): 571-581 AUG 2007

Rosen MB, Thibodeaux JR, Wood CR, et al.

Gene expression profiling in the lung and liver of PFOA-exposed mouse fetuses
TOXICOLOGY 239 (1-2): 15-33 SEP 24 2007

Toxicogenomics - Aktivitäten

- national/ deutschsprachiger Raum:
Industrie, (BfR), (BfARM)
- international/ EU:
Industrie/ ECETOC¹, NGI/ NTC², (ECVAM³)
- USA:
Industrie/ ILSI⁴/ HESI, FDA⁵, NIEHS⁶, EPA⁷, NAS⁸
- Japan: Industrie, METI⁹/ NEDO¹⁰
- international: OECD/ IPCS¹¹: „Toxicogenomics Extended Advisory Group“, ICCA¹²

¹ European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals; ² Netherlands Genomics Initiative/ Netherlands Toxicogenomics Centre; ³ European Centre for the Validation of Alternative Methods; ⁴ International Life Sciences Institute; ⁵ Food And Drug Administration; ⁶ National Institute of Environmental Health Sciences; ⁷ Environmental Protection Agency; ⁸ National Academy of Sciences; ⁹ Ministry of Economy, Trade and Industry; ¹⁰ New Energy and Industrial Technology Development Organization; ¹¹ Int. Programme on Chemical Safety; ¹² International Congress and Convention Association

Toxicogenomics im BfR

Zentrum für experimentelle Toxikologie

- Identifizierung hepatozellulärer Biomarker zur Früherkennung kanzerogener Eigenschaften von chemischen Stoffen (*in vivo* - *in vitro*)¹
- Vergleichende Proteomanalyse von Lebertumoren der Maus mit aktivierenden Mutationen in den Onkogenen β -Catenin, Ha-Ras und B-Raf nach Induktion durch Dioxin- und Phenobarbital- artige PCB (polychlorierte Biphenyle)²

Abteilung Lebensmittelsicherheit

- Identifizierung von molekularen proteomischen Biomarkern für die Risikoabschätzung von Lebensmittelinhaltsstoffen
- Effekte von durch neue technologische Verfahren hergestellte funktionelle Lebensmittel auf das Proteom von humanen Darmzellen¹

¹ gefördert durch das



² Kooperation mit Uni Tübingen, Prof. Schwarz



Risiken erkennen – Gesundheit schützen

DANKE FÜR IHRE AUFMERKSAMKEIT

Axel Oberemm

Bundesinstitut für Risikobewertung

Thielallee 88-92 • D-14195 Berlin

Tel. 0 30 - 84 12 - 0 • Fax 0 30 - 84 12 - 47 41

bfr@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de