

MicroRNAs and epigenetics in chemical carcinogenesis : an integrative toxicogenomics-based approach

Citation for published version (APA):

Rieswijk, L. (2016). *MicroRNAs and epigenetics in chemical carcinogenesis : an integrative toxicogenomics-based approach*. Uitgeverij BOXPress.

Document status and date:

Published: 01/01/2016

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting en Algemene discussie

Wereldwijd is kanker de meest voorkomende, ziekte-gerelateerde, doodsoorzaak. Er wordt verwacht dat het aantal mensen dat door deze ziekte overlijdt in de komende twintig jaar flink zal stijgen¹. Leverkanker, met name hepatocellulair carcinoma (HCC), staat in de wereld op de zesde plaats van meest gediagnostiseerde vormen van kanker en op nummer 2 als zijnde de dodelijkste vorm van kanker¹. Vooral in de minder ontwikkelde landen vormt HCC een enorm gezondheidsprobleem. HCC wordt, behalve door genetische elementen, veroorzaakt door met name biologische (bv. hepatitis-B en -C virussen) en omgevingsfactoren (bv. aflatoxine B1 blootstelling)². Ongeveer een derde van het aantal nieuwe gevallen zou voorkomen kunnen worden door een zorgvuldige controle en het vermijden van blootstelling met carcinogenen uit de omgeving (bv. chemicaliën, geneesmiddelen en voedingsstoffen)¹.

Traditioneel worden omgevingscarcinogenen gescheiden in twee verschillende groepen, gebaseerd op het verschil in werkingsmechanismen van de respectievelijke stoffen, namelijk in: genotoxische (GTX) en niet-genotoxische (NGTX) carcinogenen³. GTX-carcinogenen (GTXC) kunnen een directe reactie aangaan met het DNA, waarbij ze mutaties kunnen initiëren die kunnen leiden tot de activatie van kanker-gerelateerde processen. NGTX-carcinogenen (NGTXC) bevorderen kanker via diverse niet-DNA-reactieve mechanismen, bv. door de inductie van oxidatieve stress of via binding aan de arylhydrocarbon receptor (AhR), dan wel aan de peroxisoom proliferator geactiveerde receptor alfa (PPAR- α)⁴. Om een goede controle te garanderen en de blootstelling aan omgevingscarcinogenen te voorkomen, is nauwkeurige en gevoelige chemische risicobeoordeling van genotoxiciteit en carcinogeniteit noodzakelijk. Dit om te voorkomen dat gevaarlijke stoffen op de markt worden gebracht, om de humane blootstelling aan carcinogenen te reduceren en om het aantal nieuwe gevallen van bv. HCC te verminderen.

Nieuwe chemicaliën, geneesmiddelen of voedingsstoffen worden gewoonlijk getest in een reeks van *in vitro* genotoxiciteitstesten (bv. de bacteriële mutageniteitstest van Ames, muis lymphoma mutageen assay (MLA), micronucleus (MN) test en de chromosomale aberraties (CA) test), welke representatief zouden moeten zijn voor het carcinogene effect op de langere termijn⁵⁻⁹. Zodra een chemische stof, geneesmiddel of voedingsstof positief is bevonden op basis van deze *in vitro* testen, zullen er additionele *in vivo* testen moeten worden uitgevoerd. De huidige *in vitro* genotoxiciteitstesten worden echter gekenmerkt door een groot aantal vals positieven¹⁰. Een vals positief resultaat *in vitro* wil zeggen dat een stof positief wordt bevonden in de *in vitro* situatie, maar daadwerkelijk negatief is *in vivo*. Misschien nog wel belangrijker, NGTXC-verbindingen worden niet gedetecteerd¹¹. *In vivo* validatie van positieve resultaten van de *in vitro* genotoxiciteitstesten wordt standaard uitgevoerd door middel van een twee jaar durende studie bij knaagdieren (bv. muizen of ratten). Deze tests zijn langdurig, kosten bovendien veel geld en eisen veelal onnodig het leven van een groot aantal proefdieren. Een ander nadeel van deze tweejarige studies bij knaagdieren is dat ze vrij beperkt zijn in hun voorspellend vermogen (~ 50%)¹² van *in vivo* carcinogeniteit bij mensen. *In vivo* testen genereren een hoge mate van vals positieven (specifieke knaagdier carcinogenen) en vals negatieven (exclusief humane carcinogenen)¹². Zowel *in vitro* als *in vivo* genotoxiciteits- en carcinogeniteitstesten gaan dus gepaard met een hoog aantal vals positieven. Wegens het gebrek aan nauwkeurige en gevoelige testen, die in staat zijn om de genotoxische en (niet-genotoxisch) carcinogene potentiaal van chemische stoffen in humane risicobeoordeling te evalueren, is er een grote vraag naar betrouwbare alternatieve systemen en assays¹³.

De focus van de humane risicobeoordeling is daarom verschoven naar een benadering die meer is gericht is op de systeembioologie¹⁴⁻¹⁶. Het basis principe achter deze nieuwe strategie is

dat door het verkrijgen van een beter begrip van de biologische mechanismen die ten grondslag liggen aan genotoxiciteit en carcinogeniteit, in een meer nauwkeurige en gevoelige voorspelling kan worden voorzien, welke bruikbaar is voor de *in vivo* humane risicobeoordeling¹⁷. Het vakgebied van toxicogenomics, waarbij veelal op -omics gebaseerde high-throughput technologieën worden toegepast, lijkt veelbelovend voor het ontwikkelen van dergelijke alternatieve systemen¹⁸. Vooral met behulp van de integratie van meerdere lagen van biologische systemen kan meer inzicht worden verkregen wat kan bijdragen tot het beter begrijpen van de onderliggende carcinogene mechanismen¹⁹. Processen die de transcriptie (d.w.z. DNA-methylatie) en de translatie (d.w.z. regulatie door korte niet-coderende microRNA's) reguleren, zouden hierbij in beschouwing moeten worden genomen²⁰⁻²². Bovendien zou de identificatie van belangrijke regulatoire genen en processen die een rol spelen in zogenoemde "Adverse Outcome Pathways (AOPs)"¹⁷, relevant kunnen zijn voor voorspellingsdoeleinden binnen de humane risicobeoordeling²⁰⁻²². Veel van deze regulatoire mechanismen zijn afwijkend in het geval van ziekte, bv. in HCC. Sommige microRNA's met een tumor-onderdrukkende functie worden omlaag gereguleerd binnen HCC²³⁻²⁹. In een groot aantal studies naar HCC is aangetoond dat de promotor van specifieke tumor-onderdrukkende genen vaak een DNA-hypermethylatie vertonen, alsmede een globale genoom DNA-hypomethylatie³⁰⁻³⁷. De wisselwerking tussen de verschillende regulatoire lagen lijkt een grote invloed te hebben op het transcriptoom waarmee het lot van de cel wordt bepaald³⁸. Chemische carcinogene blootstelling lijkt ook deze regulatoire netwerken te beïnvloeden en kunnen zelfs, indien de effecten persisteren, voorspellend zijn voor de vroege tekenen van de ziekte, zoals HCC²¹. Het doel van dit proefschrift was dan ook om de rol van microRNA's en epigenetische veranderingen op het transcriptoom in deze regulatoire netwerken verder te ontrafelen na blootstelling aan GTX- en NGTX-verbindingen in de *in vitro* lever.

Identificatie van een robuust *in vitro* lever model voor genotoxiciteit en carcinogeniciteitsbepalingen

Bij de ontwikkeling van een nauwkeuriger *in vitro* systeem voor het testen van genotoxiciteit en carcinogeniteit, is het erg belangrijk dat een robuust model wordt gekozen, gebaseerd op zijn relevantie voor humane risicobeoordeling. Aangezien een groot aantal van de genotoxiciteits- en carcinogeniciteitstestresultaten afkomstig zijn van knaagdieren, is het belangrijk dat er een zekere mate van conservering van de toxische respons na blootstelling aan chemische stoffen is tussen knaagdieren en mensen. In **hoofdstuk 2** is de robuuste geconserveerde genotoxische respons, tussen drie veelgebruikte *in vitro* modellen, na blootstelling aan een prototypische GTX-verbinding, cisplatine, verder onderzocht³⁹. Transcriptoom resultaten, van cisplatine blootgestelde primaire muis hepatocyten (PMH), muis embryonale stamcellen (mES) en humane hepatocellulaire carcinoma cellijn (HepG2) voor 24 uur en 48 uur, werden vergeleken. Vierenveertig geconserveerde differentieel tot expressie gekomen genen (DEGs) konden worden geïdentificeerd. Deze genen bleken te zijn betrokken bij karakteristieke GTX-gerelateerde processen (bv. apoptose, celcyclus, DNA-schade respons en DNA-herstel). Het belang van deze geconserveerde genen werd verder ondersteund toen ze werden vergeleken met transcriptomics resultaten van GTX-blootgestelde primaire humane hepatocyten (PHH). De regulatie van de vastgestelde DEGs zijn dus geconserveerd tussen de drie *in vitro* modellen afkomstig van muis en mens. De vier transcriptiefactoren (TFs) HNF4- α , SP-1, c-MYC en p53, bleken in staat ongeveer vijftig procent van DEGs te reguleren voor alle modellen en blootstellingsperiodes. Uit **hoofdstuk 2** kunnen we concluderen dat de robuuste genotoxische respons vooral werd bepaald door een complex geconserveerd regulatoir netwerk van 4 TFs. Daarnaast, als gevolg van een lage reactie op het transcriptoom niveau in het niet-lever model mES en de verminderde metabole capaciteit van HepG2 cellen, werd het PMH model gekozen

als een geschikt model voor onze verdere blootstellingsonderzoeken met GTX- en NGTX-verbindingen.

Begrip van de regulerende netwerken die ten grondslag liggen aan het werkingmechanisme van GTXC- en NGTXC-verbindingen

Het basisprincipe van het ontwikkelen van een verbeterd *in vitro* model voor genotoxiciteit en carcinogeniteitstesten is dat het GTXC moet kunnen onderscheiden van NGTXC. Om dit te bewerkstelligen zullen de regulatoire mechanismen die ten grondslag liggen aan de toxische en carcinogene effecten van GTXC en NGTXC, in ons geval leidend tot HCC, verder moeten worden onderzocht. Voor deze doeleinden is het robuuste *in vitro* lever model PMH, toegepast in **hoofdstuk 2**, opnieuw gebruikt in **hoofdstuk 3**. In deze studie werden PMH blootgesteld voor 24 en 48 uur aan drie prototypische GTXC- (d.w.z. aflatoxine B1, benzo [a] pyreen en cisplatine) en drie NGTXC (2,3,7,8-tetrachloordibenzodioxine, cyclosporine A en Wy-14643) -verbindingen met verschillende werkingsmechanismen⁴⁰. Op basis van transcriptoom resultaten van deze blootgestelde PMH konden onderscheidende sets van genen en microRNA's en kenmerkende processen worden verkregen. Na 48 uur blootstelling, waren deze waarnemingen het meest duidelijk. Een microRNA-target gen interactie, in het bijzonder mmu-miR-503-5p met cycline D2, bleek duidelijk onderscheidend te zijn tussen PMH behandeld met GTXC- of NGTXC-verbindingen. Deze interactie lijkt belangrijk te zijn binnen de p53 signaleringsroute en zou een rol kunnen spelen in metabolisme-gerelateerde processen. Speciaal voor PMH behandeld met NGTXC-verbindingen is deze interactie relevant, omdat het naar verwachting een oncogene functie zal hebben door het stimuleren van Ccnd2. Dit kan leiden tot een tumorigene celcyclus progressie. Voor PMH behandeld met GTXC-verbindingen, konden voornamelijk verbindingsspecifieke microRNA-target gen interacties worden geïdentificeerd. De interactie mmu-miR-301b-3p met Paps2 leek relevant te zijn in PMH behandeld met aflatoxine B1, terwijl mmu-miR-29b-3P met Col4a2 en mmu-miR-24-3p met FLNA meer prominent bleken te zijn na benzo(a)pyreen blootstelling. Deze interacties participeren voornamelijk in de celcyclus en dragen bij aan de remming van het DNA-schadeherstel, welke belangrijke processen zijn in GTX-geïnduceerde carcinogenese. Uit de verkregen resultaten van **hoofdstuk 3** concluderen wij dat microRNA's, naast de TFs van **hoofdstuk 2**, weer een ander relevant intracellulair regulerend niveau vertegenwoordigen in de chemisch-geïnduceerde carcinogenese door GTXC- en NGTXC-verbindingen.

De bruikbaarheid van microRNA expressie profielen van de blootgestelde PMH voor genotoxiciteits- of carcinogeniciteitsbepalingen

Voor de ontwikkeling van een nauwkeuriger en gevoeliger alternatief, op lever-gebaseerd *in vitro*-systeem voor genotoxiciteits- en carcinogeniteitbepalingen, is het belangrijk dat het in staat is om onderscheid te maken tussen de verbindingen met verschillende eigenschappen. Huidige *in vitro*-testen genereren een groot aantal vals positieven; dit geeft aan dat de verbinding GTX is *in vitro*, maar niet in de *in vivo* situatie. Bovendien zijn de huidige testen niet in staat om NGTXC te detecteren. Ten gevolge daarvan, is er een grote vraag naar de ontwikkeling van alternatieve assays die meer betrouwbaar zijn in het voorspellen van de humane genotoxische en carcinogene potentiaal van verbindingen. In **hoofdstuk 4** hebben we ons gericht op de ontwikkeling van een alternatief *in vitro*-model dat in staat is om nauwkeurig een onderscheid te maken tussen PMH behandeld met GTX-verbindingen van cellen behandeld met NGTX-verbindingen. Een tweede voorspellend model werd gegenereerd om een betrouwbaar onderscheid te maken tussen PMH behandeld met NGTXC verbindingen en cellen blootgesteld aan niet-carcinogene stoffen (NC). Naar aanleiding van de resultaten beschreven in **hoofdstuk 3**, lijken microRNA's een belangrijke rol te spelen in regulatoire netwerken,

essentieel in de chemische carcinogenese geïnduceerd door GTX- en NGTX-verbindingen. We veronderstelden om deze reden, dat de reactie-patronen van de veranderde microRNA's gebruikt kunnen worden voor voorspellingsdoeleinden. Daarom hebben we de lijst van stoffen die worden gebruikt in **hoofdstuk 3** uitgebreid met vijftien additionele prototypisch modelverbindingen van ofwel de GTX of de NGTX toxiciteitsklassen. Om de bruikbaarheid van microRNA-expressie profielen voor classificatie doeleinden te bepalen, werden de resultaten van de microRNA-gebaseerde benadering vergeleken met mRNA-gebaseerde classificatieresultaten. Om te voorkomen dat de selectie van kandidaat-mRNA of -microRNA afhankelijk zou zijn van de samenstelling van de training- en de testset, werden tien verschillende sets van training- en testverbindingen gegenereerd. Daarnaast werd een leave-one-out-gebaseerde voorselectie uitgevoerd om te voorkomen dat de identificatie van kandidaat-mRNA of -microRNA afhankelijk zou zijn van verbindingsspecifieke effecten. Statistisch significante mRNA's (DEGs) en microRNA's (DE-miRs), die overlappend waren tussen de verschillende sets van de training- en testverbindingen, werden vervolgens geïdentificeerd. Met slechts deze specifieke kandidaten werd de voorspellingsanalyse uitgevoerd met behulp van de tien verschillende training- en testsetcomposities, door toepassing van de zogenoemde "nearest-shrunken-centroid"-methode binnen het "Prediction Analysis for Microarrays (PAM)"-programma. Helaas waren we niet in staat om overlappende DE-miRs te identificeren die geschikt waren om GTX of NGTX *in vivo* nauwkeurig te kunnen voorspellen. Daarentegen, in het bijzonder na de 48-urige blootstellingsperiode, zijn twee kandidaat-DEGs geïdentificeerd die in staat zijn *in vivo* GTX te voorspellen. Een gemiddelde nauwkeurigheid van 93% (een gevoeligheid van 75% en een specificiteit van 100%) kon worden bereikt voor het voorspellen van de verbindingen in de testset. Tributylinoxide (TBTO), die een onbeslist GTX karakter heeft, werd foutief geïdentificeerd. Ook voor het voorspellen van *in vivo* NGTX, werd een voorspellend model op basis van mRNA-expressie profielen ontwikkeld. Drie DEGs konden worden geïdentificeerd na 48 uur blootstelling, wat resulteerde in een model dat NGTX kan voorspellen met een nauwkeurigheid van 88% (een gevoeligheid van 83% en een specificiteit van 93%). Ondanks de relatief hoge nauwkeurigheid en gevoeligheid van het voorspellende model, werd Wy-14643 (Wy) foutief geïdentificeerd. De carcinogene potentiaal van Wy in PMH is twijfelachtig in de afwezigheid van naburige Kupffercellen en kan dus worden gemist binnen het momenteel toegepaste *in vitro*-lever model. Uit de bevindingen in **hoofdstuk 4** hebben we geconcludeerd dat de mRNA-gebaseerde voorspelling van GTX en NGTX beter presteert dan de gelijkwaardige microRNA-gebaseerde voorspelling. Met de momenteel gebruikte set van verbindingen, is de microRNA-gebaseerde voorspelling van deze eigenschappen niet mogelijk, echter een breder scala van prototypische verbindingen zouden moeten worden onderzocht om deze negatieve bevindingen verder te valideren.

Regulatoire interactie netwerken in relatie tot GTX-blootstelling en geassocieerd met HCC

Een andere vereiste voor de ontwikkeling van een alternatief *in vitro*-systeem is dat het relevant is voor de humane *in vivo* situatie. De beste optie voor een dergelijke robuust testsysteem is het gebruik van primaire humane hepatocyten (PHH)^{41,42}. Vaak bestaan er echter inter-individuele verschillen tussen verschillende hepatocyt donoren en daarom is het uiterst ingewikkeld om uit deze resultaten algemene conclusies te trekken die relevant zijn voor humane risicobeoordeling. Een oplossing voor dit probleem is het kweken van hepatocyten van verschillende donoren samen in een petrischaal om een algemenere GTX-respons te genereren die relevanter zou kunnen zijn voor humane chemische risicobeoordeling van carcinogene stoffen. Aflatoxine B1 (AFB1), geproduceerd door *Aspergillus* schimmels, is een van de meest

potente GTX-hepatocarcinogenen, die is staat om AFB1-adducten te induceren met bv. DNA en daarbij mutaties te initiëren die uiteindelijk kunnen leiden tot de ontwikkeling van HCC. Minder is bekend over de mogelijke epigenetische veranderingen die GTX, specifiek AFB1, zouden kunnen veroorzaken in deze regulatoire netwerken, waarbij ook microRNA's een rol spelen die kunnen leiden tot de inductie van HCC. Veranderingen van epigenetische DNA-methylatie patronen (bevestiging of verwijdering van specifieke methylgroepen op het DNA die genexpressie kunnen beïnvloeden) kunnen in combinatie met microRNA-expressie veranderingen kenmerkend zijn voor een bepaald type GTX-blootstelling. Specifiek veranderde regulatoire genen of netwerken kunnen ook worden gebruikt als potentiële kandidaten voor genotoxiciteits- en carcinogeniciteitstesten. In **hoofdstuk 5** werd een kweekpool van gecryopreserveerde PHH behandeld met twee doses (laag: 0,3 μM en matige: 1 μM) van de prototypische GTX-verbinding, aflatoxine B1 (AFB1). Na een vijfdaagse herhaalde blootstelling werden de PHH geoogst en microRNA- en mRNA-expressie veranderingen gemeten tezamen met DNA-methylatie veranderingen in het promotor gebied van de respectievelijke genen. Om de relevantie van de *in vitro* waargenomen transcriptoom veranderingen, ten opzichte van het risico op HCC *in vivo* te evalueren, werden de resultaten vergeleken met een kenmerkend genexpressie profiel gebaseerd op data van HCC patiënten⁴³. Alsmede werden de resultaten vergeleken met een lijst van bekende AFB1-responsieve genen, verkregen uit de zogeheten “Comparative Toxicogenomics Database (CTD)”⁴⁴. Een opmerkelijke bevinding was dat PHH blootgesteld gedurende vijf dagen aan 0,3 μM AFB1 meer veranderingen lieten zien op het DNA methylatieniveau in vergelijking met cellen blootgesteld aan 1 μM AFB1. In het algemeen werden er meer DNA-hypomethylatieveranderingen gemeten als gevolg van AFB1 behandeling dan DNA-hypermethylatieveranderingen. Bij het vergelijken van PHH blootgesteld aan 0,3 μM en 1 μM AFB1 werd een grote reeks aan genen geïdentificeerd die gemeenschappelijk waren veranderd op het DNA-methylatieniveau tussen de twee doses. Zodra de methylatieresultaten werden gecombineerd met de transcriptoomdata, bleef er een veel kleinere set van veranderde genen over, wat aangeeft dat veranderingen op het DNA-methylatieniveau niet altijd rechtstreeks van invloed zijn op genexpressie niveaus. Toen AFB1-geïnduceerde DEGS, die veranderd waren op het DNA-methylatie niveau, werden gecombineerd met DE-miRs konden HCC-gerelateerde biologische processen zoals metabolisme, nucleïnezuurmetabolisme, DNA-herstel, celcyclus, apoptose, immuunrespons en ionentransport worden vastgesteld. Specifieke pathways binnen deze AFB1-geïnduceerde biologische processen bleken betrokken bij signaaltransductie cascades. Hierbij konden een aantal microRNA-target genen worden geïdentificeerd bestaande uit ARHGAP35, ILK, PPP2R1A, RB1, TFAP2A, HIST1H4D, RhoA, CDK4 en UBC. Deregulering van deze genen en signaaltransductie cascades zijn belangrijke kenmerken van HCC⁴⁵. De bevindingen uit **hoofdstuk 5** dragen bij aan een beter begrip van GTX-geïnduceerde veranderingen in regulatoire netwerken die zouden kunnen leiden tot de ontwikkeling van HCC.

Persistentie van de GTX-geïnduceerde veranderingen in de regulatoire netwerken die relevant zijn voor de initiatie van HCC

Om te concluderen of *in vitro*-carcinogeen-geïnduceerde veranderingen in regulatoire netwerken relevant zijn voor de *in vivo* ziekte-toestand en daarom bruikbaar zijn voor humane risicobeoordeling, is het essentieel dat deze veranderingen persistent en blijvend onomkeerbaar zijn wanneer de carcinogene behandeling wordt beëindigd. In **hoofdstuk 6** hebben we daarom onderzocht of de veranderingen op het transcriptoom- en het microRNA-omniveau, die zijn waargenomen in een kweekpool van gecryopreserveerde PHH na een vijfdaagse challenge met 1 μM AFB1, blijven bestaan nadat de carcinogene behandeling is gestopt (= uitwasperiode).

Ook in **hoofdstuk 6** en **hoofdstuk 7** werden veranderingen in het transcriptoom vergeleken met een signatuur HCC-expressie profiel, verkregen uit de lever transcriptoomgegevens van HCC-patiënten, en een lijst van bekende AFB1-induceerbare genen. Een specifiek regulatorisch netwerk, gestuurd door de twee persistent tot expressie gekomen en HCC-gerelateerde microRNA's hsa-miR-34b-5p^{46,47} en hsa-miR-222-3p²⁵, lijkt een rol te spelen in een aantal karakteristieke AFB1-geïnduceerde processen, refererend aan metabolische veranderingen geassocieerd met kanker en regulatie van genexpressie. Bovendien lijken hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-96-5p en hsa-miR-30a-3p, die alleen na beëindiging van de 1 μ M AFB1-behandeling differentieel tot expressie komen, persistent tot expressie gekomen HCC-gerelateerde genen te reguleren. Daarnaast werden persisterende veranderingen in PHH veroorzaakt door 0,3 μ M AFB1-behandeling op het methyloom-, microRNA- en transcriptoomniveau verder onderzocht in **hoofdstuk 7**, wanneer de blootstelling aan de carcinogene stof werd beëindigd. Na blootstelling aan deze lagere AFB1 dosis, konden geen DE-miRs worden geïdentificeerd die nog werden aangetroffen na de driedaagse uitwasperiode. Daarentegen werden, na het combineren van transcriptoomdata met resultaten van DNA-methylatie, diverse persistent veranderde hyper- en hypo-gemethyleerde genen geïdentificeerd, die ook blijvend veranderd waren op het transcriptoomniveau. De zes geïdentificeerde genen, die blijvend hypo-gemethyleerd en omhoog gereguleerd waren (d.w.z. TXNRD1, PCNA, CCNK, DIAPH3, RAB27A en HIST1H2BF), konden in verband worden gebracht met carcinogene processen. De bevindingen uit **hoofdstuk 6** en **hoofdstuk 7** kunnen daarom bijdragen aan een beter begrip van blijvende microRNA en epigenetische veranderingen, geïnduceerd na GTX blootstelling, binnen regulatorische netwerken, die voorspellend kunnen zijn voor het uiteindelijke ontstaan van HCC.

Conclusie

In het algemeen is het doel om de rol van microRNA en epigenetica in transcriptoom veranderingen, geïnduceerd door GTX- en NGTX-verbindingen, in diverse *in vitro*-levermodellen verder te verhelderen, bereikt. We zijn in staat om robuuste responsen, na blootstelling aan de GTX-verbinding cisplatine (**hoofdstuk 2**), tussen verschillende *in vitro*-modellen te identificeren. Deze robuuste respons werd hoofdzakelijk bepaald door een complex geconserveerd regulatorisch netwerk van 4 TFs. Hiermee wordt het belang van het bestuderen van regulatorische mechanismen in de respons op GTX-blootstelling versterkt. Veranderingen in TF regulatorische netwerken zijn al eerder onderzocht, omdat wordt aangenomen dat deze tijdens de evolutie zijn geconserveerd. Bovendien is er aangetoond dat deze regulatorische netwerken een belangrijke rol spelen bij de reactie op het transcriptoomniveau in HepG2-cellen die werden blootgesteld aan de GTX-verbinding benzo(a)pyreen^{48,49}. Deze kennis over de rol van regulatorische netwerken in de chemische carcinogenese uit **hoofdstuk 2** is uitgebreid met twee additionele studies waarin meer chemische verbindingen werden gebruikt, om zo de robuuste respons te bestuderen in het *in vitro*-levermodel PMH. MicroRNA- en mRNA-expressie veranderingen zijn hierbij in beschouwing genomen. In de eerste studie (**hoofdstuk 3**), waarbij PMH zijn onderzocht na blootstelling aan 3 GTX- en 3 NGTX-verbindingen, werd vooral mmu-microRNA-503-5p gevonden, die een verschillende rol uitoefent binnen de twee groepen van carcinogenen. In deze studie werden echter voornamelijk verbindingsspecifieke microRNA-veranderingen waargenomen. In de tweede, meer uitgebreide studie (**hoofdstuk 4**) konden we daarom ook concluderen dat, aangezien de meeste van de microRNA-expressie veranderingen die optreden na kortetermijn-blootstelling verbindingsspecifiek zijn, deze niet succesvol gebruikt kunnen worden voor de voorspelling van eigenschappen van verbindingen alsook in *in vivo* genotoxiciteit of carcinogeniciteitstesten. Deze bevindingen werden bevestigd door *in vivo*-resultaten, verkregen door Melis en collega's⁵⁰,

die niet in staat waren om een nauwkeurig onderscheid te maken tussen GTXC- en NGTXC-verbindingen, op basis van microRNA-expressie profielen afkomstig van muizen, die alvorens zeven dagen waren blootgesteld. MicroRNA-expressie veranderingen zijn echter van toegevoegde waarde, als het gaat om het bestuderen van het werkingsmechanisme van NGTXC-verbindingen, zoals beschreven in **hoofdstuk 3**. Uit deze studie werd geconcludeerd dat het onderscheid tussen PMH behandeld met GTX-verbindingen van cellen behandeld met NGTX-verbindingen en NGTXC-behandelde PMH van NC-behandelde cellen, het meest succesvol is wanneer genexpressie profielen worden gebruikt. Relevante discriminerende DE-mRNA zijn geïdentificeerd die een duidelijke connectie hadden met GTX- en carcinogeenblootstellingen. MicroRNA-expressie veranderingen zijn niet bruikbaar als voorspellende kandidaten voor *in vivo* genotoxiciteit- en carcinogeniciteitstesten. De analyses van carcinogeen-geïnduceerde veranderingen op het microRNA-niveau, in combinatie met hun targetgenen, zijn wel erg belangrijk als het gaat om nieuwe inzichten in de biologische mechanismen van bv. NGTX-carcinogenese. Bv. als het gaat om de tumorigene progressie van de celcyclus via mmu-miR-503-5p en cycline D2, die een rol kunnen spelen binnen de ontwikkeling van HCC op de langere termijn. Dit is in overeenstemming met de hypothese dat chemisch-geïnduceerde microRNA-expressiealteraties representatief kunnen zijn voor de optredende veranderingen in HCC²². MicroRNA-expressie veranderingen in combinatie met expressiemodificaties van de targetgenen, weergegeven als microRNA-gestuurde regulatoire netwerken, kunnen derhalve bruikbaar zijn bij de ontwikkeling van zogenoemde AOPs belangrijk binnen de humane risicoanalyse. Uit de studies met PHH (**hoofdstuk 5-7**) concluderen wij dat specifieke veranderingen op het microRNA-expressieniveau naast transcriptoomveranderingen persistent kunnen zijn wanneer de behandeling met een GTXC-verbinding wordt beëindigd (**hoofdstuk 6**). Dit is voornamelijk het geval in PHH die werden behandeld met 1 μM van de model GTXC-verbinding AFB1. Naast veranderingen op het microRNA-niveau, lijken ook persistente DNA-methylatieveranderingen op te treden nadat de 0,3 μM AFB1-blootstelling is beëindigd. Hierdoor kunnen ook genexpressie veranderingen van verschillende genen optreden, die kunnen bijdragen aan een patroon kenmerkend voor een bepaalde ziekte, zoals HCC (**hoofdstuk 7**). Evalueren van genexpressieresultaten met een bepaalde, reeds bestaande signatuurprofiel, gebaseerd op HCC-patiëntendata, is daarbij een cruciale stap. De bevinding dat HCC-gerelateerde persistente veranderingen *in vitro* optreden in PHH, na beëindiging van de carcinogene behandeling op het niveau van het transcriptoom, microRNA-omvang en/of methylom, is nieuw in het vakgebied van toxicogenomics. Vooral deze persistente, epigenetisch veranderde genen en microRNA's zijn de meest relevante potentiële biomarker kandidaten voor chemisch-geïnduceerde (hepato-) carcinogenese. Daarom kan deze specifieke mechanistische informatie over deze HCC-gerelateerde, persistente veranderde, epigenetisch- en microRNA-gestuurde regulatoire netwerken, gebruikt worden voor de ontwikkeling van AOP, en daarmee bijdragen aan de toekomstige risicoanalyse van humane carcinogenen.

Beperkingen en toekomstige aanbevelingen

Veelbelovende resultaten zijn verkregen, die wellicht meer inzicht kunnen verschaffen in de rol van epigenetische- en microRNA-gestuurde regulatoire mechanismen, die op hun beurt van belang zijn voor (hepato-) carcinogenese, geïnduceerd door GTXC- en NGTXC-verbindingen. Deze kennis kan, op de lange termijn, worden gebruikt voor de ontwikkeling van AOPs, die belangrijk zijn in de humane risicobeoordeling van chemische stoffen, geneesmiddelen en voedingsstoffen. Deze mechanistische resultaten, over de rol van microRNA's en epigenetica in de chemische carcinogenese, zijn preliminair en kunnen daarom de basis vormen voor toekomstige studies. Toekomstig onderzoek zou zich vooral moeten richten op het valideren

van de verkregen resultaten aangaande het gebruik van microRNA-expressieniveau voor voorspellingsdoeleinden, bij voorkeur met behulp van PHH, door het evalueren een groter aantal verbindingen. Dit onderzoek zou dan na moeten gaan of de microRNA-expressiepatronen inderdaad niet waardevol zijn voor voorspellingsdoeleinden. Daarnaast zouden andere methodes kunnen worden toegepast die zich meer richten op een netwerkgebaseerde voorselectie of het positioneren van relevante microRNA's voor het voorspellen van genotoxiciteit en niet-genotoxische carcinogeniteit *in vivo*. Recentelijk is er een dergelijke methode ontwikkeld voor de rangschikking van microRNA's op basis van hun relevantie in een bepaalde ziekte⁵¹. Bij voorkeur GTXC-, NGTXC- en NC-verbindingen zouden moeten worden gebruikt en hun verschillende werkingsmechanismen zouden in beschouwing moeten worden genomen, bv. voor read-across initiatieven, zoals bij zogenoemde "connectivity mapping"-methode^{52,53}. Voorts dient persistentie van de verkregen effecten te worden bekeken, omdat deze bijzonder relevant is voor de ontwikkeling van HCC^{21,54}. Daarom zouden er goed ontworpen tijdreeks studies moeten worden uitgevoerd, die zich richten op de reeks van gebeurtenissen die plaatsvinden na carcinogene behandeling. Op deze manier kan informatie worden verkregen, met betrekking tot de reactie tijd van microRNA's in PHH, na blootstelling aan verschillende GTXC- en NGTXC-verbindingen. Bovendien moet de invloed van de microRNA-target gen-interacties worden bevestigd op het eiwitniveau, speciek in PHH, om zo de daadwerkelijke invloed van de microRNA-suppressie op genexpressieniveau te meten⁵⁵. Daarnaast zullen de resultaten die in PHH verkregen zijn, moeten worden uitgebreid met meer verbindingen, van verschillende toxiciteitsklassen, om zo meer informatie te genereren met betrekking tot de epigenetische- en microRNA-gestuurde regulatoire netwerken, die zijn veranderd na blootstelling aan GTXC- of NGTXC-verbindingen. Om de epigenetische mechanismen volledig te dekken, zullen ook histonacetyleringsveranderingen moeten worden gemeten. Specifieke, kenmerkende epigenetische- en microRNA-gestuurde genexpressie profielen kunnen worden verkregen, die vervolgens de basis kunnen vormen voor de ontwikkeling van mechanistisch-gebaseerde AOPs. Daarom moeten de verkregen resultaten worden gekoppeld aan toxicologische eindpunten (d.w.z. fenotypische verankering)⁵⁶, die kenmerkend zijn voor een bepaalde klasse van verbindingen, zoals bv. DNA-adduct vorming of de aanwezigheid van zuurstof radicalen. Bovendien moeten meer hepatocyt-donoren worden gebruikt, die de verkregen resultaten verder zouden kunnen ondersteunen en die bovendien meer representatief zouden kunnen zijn voor de humane situatie. Andere alternatieve systemen, zoals driedimensionale organotypische lever-organoïde en -sferoïde⁵⁷ celkweeksystemen zoals bv. pluripotente stamcellen afgeleide hepatocytes⁵⁸ of hepatocyt co-culturen zouden kunnen worden gebruikt, die meer representatief zijn voor de humane *in vivo* lever⁵⁹. Deze driedimensionale lever-organoïde/-sferoïde celculturen worden geprefereerd, gezien hun herstelde extracellulaire matrix, en daardoor verbeterde hepatocyt-celpolariteit. Door het herstel van deze kenmerken van de lever lijken de cellen hun metabolische competentie te behouden en kunnen daarom gedurende een langere periode worden gekweekt⁵⁹. Vooral de co-culturen van humane hepatocyten met bv. Kupffercellen (macrofagen), sinusoidale endotheelcellen en stellaatcellen (stromale cellen) blijken succesvol in het nabootsen van de *in vivo* humane situatie⁵⁹. Een dergelijk co-cultuurmodel van hepatocyten, die in kweek kan worden gehouden voor een langere periode, kan verder helpen bij het bestuderen van de waargenomen effecten van persistente carcinogene blootstelling.

De huidige bevindingen van dit proefschrift, in combinatie met additionele cross-omics gebaseerde toekomstige experimenten, kunnen nieuwe inzichten verschaffen in de regulatoire netwerken, die bijdragen aan het werkingsmechanisme van carcinogene chemische stoffen, welke een voorspellende waarde zouden kunnen geven bij de humane risicobeoordeling.

Referenties

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-86 (2015).
2. Kew, M.C. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointestin Liver Dis* 22, 305-10 (2013).
3. Ashby, J. Use of short-term tests in determining the genotoxicity or nongenotoxicity of chemicals. *LARC Sci Publ*, 135-64 (1992).
4. Silva Lima, B. & Van der Laan, J.W. Mechanisms of nongenotoxic carcinogenesis and assessment of the human hazard. *Regul Toxicol Pharmacol* 32, 135-43 (2000).
5. Ames, B.N., Lee, F.D. & Durston, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 782-6 (1973).
6. Kirkland, D., Reeve, L., Gatehouse, D. & Vanparrys, P. A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins. *Mutat Res* 721, 27-73 (2011).
7. Matsushima, T. *et al.* Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 14, 569-80 (1999).
8. Moller, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96 Suppl 1, 1-42 (2005).
9. Shelby, M.D. & Witt, K.L. Comparison of results from mouse bone marrow chromosome aberration and micronucleus tests. *Environ Mol Mutagen* 25, 302-13 (1995).
10. Kirkland, D. *et al.* How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res* 628, 31-55 (2007).
11. Hernandez, L.G., van Steeg, H., Luijten, M. & van Benthem, J. Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutat Res* 682, 94-109 (2009).
12. Ennever, F.K. & Lave, L.B. Implications of the lack of accuracy of the lifetime rodent bioassay for predicting human carcinogenicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 38, 52-7 (2003).
13. Kirkland, D. Improvements in the reliability of in vitro genotoxicity testing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7, 1513-20 (2011).
14. Kitano, H. Computational systems biology. *Nature* 420, 206-10 (2002).
15. Kleinjans, J. *Toxicogenomics-based cellular models : alternatives to animal testing for safety assessment*, xviii, 348 p. (Elsevier/AP, Amsterdam, 2014).
16. Piersma, A.H. *et al.* A critical appraisal of the process of regulatory implementation of novel in vivo and in vitro methods for chemical hazard and risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 44, 876-94 (2014).
17. Ankley, G.T. *et al.* Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 29, 730-41 (2010).
18. National Research Council (U.S.). Committee on Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology. *Applications of toxicogenomic technologies to predictive toxicology and risk assessment*, xxii, 275 p. (National Academies Press, Washington, D.C., 2007).
19. Olden, K. Toxicogenomics--a new systems toxicology approach to understanding of gene-environment interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1076, 703-6 (2006).
20. Goodman, J.I. *et al.* What do we need to know prior to thinking about incorporating an epigenetic evaluation into safety assessments? *Toxicol Sci* 116, 375-81 (2010).
21. Mirbahai, L. & Chipman, J.K. Epigenetic memory of environmental organisms: a reflection of lifetime stressor exposures. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 764-765, 10-7 (2014).
22. Izzotti, A. & Pulliero, A. The effects of environmental chemical carcinogens on the microRNA machinery. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 217, 601-627 (2014).
23. Giordano, S. & Columbano, A. MicroRNA's: new tools for diagnosis, prognosis, and therapy in hepatocellular carcinoma? *Hepatology* 57, 840-7 (2013).
24. Gramantieri, L. *et al.* MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med* 12, 2189-204 (2008).
25. Karakatsanis, A. *et al.* Expression of microRNA's, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol Carcinog* 52, 297-303 (2013).
26. Li, J., Wang, Y., Yu, W., Chen, J. & Luo, J. Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance. *Biochem Biophys Res Commun* 406, 70-3 (2011).
27. Pineau, P. *et al.* miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 264-9 (2010).
28. Sun, J., Lu, H., Wang, X. & Jin, H. MicroRNA's in hepatocellular carcinoma: regulation, function, and clinical implications. *ScientificWorldJournal* 2013, 924206 (2013).

29. Xiong, Y. *et al.* Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 51, 836-45 (2010).
30. Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M. & Issa, J.P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72, 141-96 (1998).
31. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21 (2002).
32. Bollati, V. *et al.* Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNA's in peripheral blood leukocytes. *Environ Health Perspect* 118, 763-8 (2010).
33. Cheng, Y. *et al.* Correlation of CpG island methylator phenotype with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol* 88, 112-7 (2010).
34. Hernandez-Vargas, H. *et al.* Hepatocellular Carcinoma Displays Distinct DNA Methylation Signatures with Potential as Clinical Predictors. *PLoS ONE* 5, e9749 (2010).
35. Lee, Y.W. *et al.* Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Mol Cell Biol* 15, 2547-57 (1995).
36. Shen, J. *et al.* Genome-wide aberrant DNA methylation of microRNA host genes in hepatocellular carcinoma. *Epigenetics* 7, 1230-7 (2012).
37. Zhang, Y.J. *et al.* Global hypomethylation in hepatocellular carcinoma and its relationship to aflatoxin B(1) exposure. *World J Hepatol* 4, 169-75 (2012).
38. Osella, M., Riba, A., Testori, A., Cora, D. & Caselle, M. Interplay of microRNA and epigenetic regulation in the human regulatory network. *Front Genet* 5, 345 (2014).
39. Rieswijk, L., Lizarraga, D., Brauers, K.J., Kleinjans, J.C. & van Delft, J.H. Characterisation of cisplatin-induced transcriptomics responses in primary mouse hepatocytes, HepG2 cells and mouse embryonic stem cells shows conservation of regulating transcription factor networks. *Mutagenesis* 29, 17-26 (2014).
40. Rieswijk, L. *et al.* Evaluating microRNA profiles reveals discriminative responses following genotoxic or non-genotoxic carcinogen exposure in primary mouse hepatocytes. *Mutagenesis* (2015).
41. Lecluyse, E.L. & Alexandre, E. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol Biol* 640, 57-82 (2010).
42. Hewitt, N.J. *et al.* Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 39, 159-234 (2007).
43. Caiment, F., Tsamou, M., Jennen, D. & Kleinjans, J. Assessing compound carcinogenicity in vitro using connectivity mapping. *Carcinogenesis* 35, 201-7 (2014).
44. Davis, A.P. *et al.* The Comparative Toxicogenomics Database: update 2013. *Nucleic Acids Res* 41, D1104-14 (2013).
45. Hanahan, D. & Weinberg, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674 (2011).
46. Hermeking, H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 17, 193-9 (2010).
47. Xu, Y. *et al.* A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with an increased risk for primary hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 128, 412-7 (2011).
48. Vaquerizas, J.M., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A. & Luscombe, N.M. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet* 10, 252-63 (2009).
49. van Delft, J.H. *et al.* Time series analysis of benzo[A]pyrene-induced transcriptome changes suggests that a network of transcription factors regulates the effects on functional gene sets. *Toxicol Sci* 117, 381-92 (2010).
50. Melis, J.P. *et al.* In vivo murine hepatic microRNA and mRNA expression signatures predicting the (non-)genotoxic carcinogenic potential of chemicals. *Arch Toxicol* (2014).
51. Le, D.H. Network-based ranking methods for prediction of novel disease associated microRNA's. *Comput Biol Chem* 58, 139-148 (2015).
52. Caiment, F., Tsamou, M., Jennen, D. & Kleinjans, J. Assessing compound carcinogenicity in vitro using connectivity mapping. *Carcinogenesis Advance Access published August 12, 2013*, doi:10.1093/carcin/bgt278 (2013).
53. Lamb, J. *et al.* The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 313, 1929-35 (2006).
54. Heijmans, B.T. *et al.* Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17046-9 (2008).
55. Selbach, M. *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNA's. *Nature* 455, 58-63 (2008).
56. Waters, M.D. & Fostel, J.M. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nat Rev Genet* 5, 936-948 (2004).
57. Hynds, R.E. & Giangreco, A. Concise review: the relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine. *Stem Cells* 31, 417-22 (2013).
58. Davidson, M.D., Ware, B.R. & Khetani, S.R. Stem cell-derived liver cells for drug testing and disease modeling. *Discov Med* 19, 349-58 (2015).
59. Soldatow, V.Y., LeCluyse, E.L., Griffith, L.G. & Rusyn, I. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicology research* 2, 23-39 (2013).