

# Immunotoxicogenomics : gene expression profiling as a tool to study immunotoxicity

## Citation for published version (APA):

Baken, K. A. (2007). *Immunotoxicogenomics : gene expression profiling as a tool to study immunotoxicity*. Datawise / Universitaire Pers Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2007

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

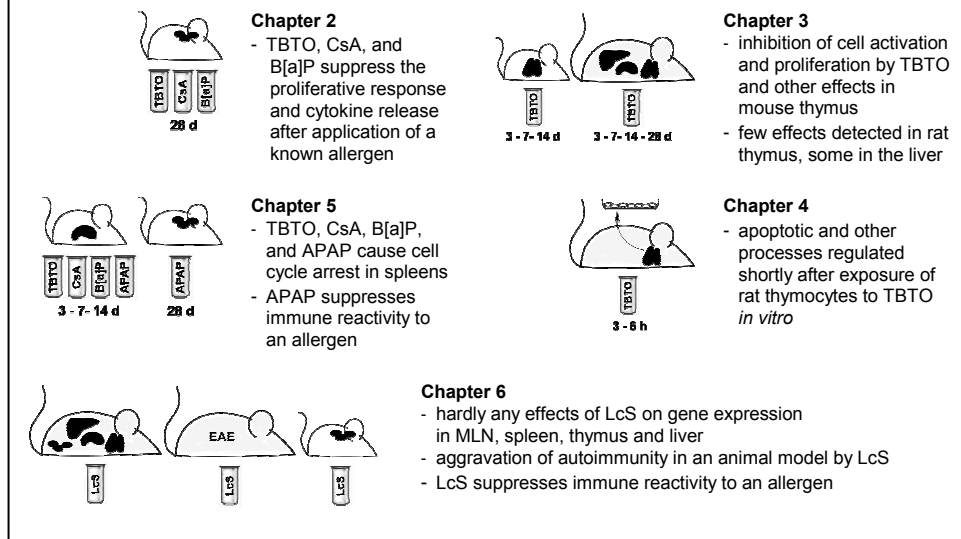


# **S**ummary and general discussion

### Main findings

Microarray analysis is used for simultaneous measurement of expression of thousands of genes in a given sample and as such extends and deepens our understanding of biological processes. Application of this technique to study adverse effects of xenobiotics is referred to as toxicogenomics. Adverse effects of interactions of substances with the immune system have traditionally been assessed by evaluation of changes in organ weights, histopathology of immunological tissues, and various immune function tests. Gene expression profiling is a relatively new approach to study immunotoxicity. Examples of immunotoxicogenomics studies that have appeared in the literature (**Chapter 1** and [1]) show that microarray analysis is able to detect known and novel effects of a wide range of immunomodulating agents. They also show, however, the impact of dose, duration of exposure, and number of genes examined on the outcome of microarray analysis and illustrate the importance of anchoring gene expression profiles to pathological and functional endpoints for correct interpretation of results. Besides the elucidation of mechanisms of action, toxicogenomics is also applied to predict consequences of exposing biological systems to toxic agents. Successful attempts to classify compounds using signature gene expression profiles have been reported outside the area of immunotoxicology. Databases containing expression profiles can facilitate the application of toxicogenomics. Platforms and methodologies for gene expression profiling may vary, however, hampering data compiling across different laboratories. Therefore, attention is paid to standardization of the generation, reporting, and management of microarray data. The application of toxicogenomics in evaluation of immunotoxicity is thus not without challenges. It already contributes to the understanding of immunotoxic processes and the development of *in vitro* screening assays, though, and is therefore expected to be of value for mechanistic insight into immunotoxicity and for hazard identification of existing and novel compounds. We tested these assumptions by performing a range of experiments evaluating the applicability of gene expression profiling for identification of immunotoxic events. The main findings of these studies are summarized in Box I and described below.

**BOX I – MAIN FINDINGS**



*Application of the LLNA as an immune function assay*

The murine Local Lymph Node Assay (LLNA) was originally designed as a screening system for allergenicity of chemicals, in which the proliferative response of draining lymphocytes to cutaneous application of a contact sensitizer indicates the sensitizing capacity. In **Chapter 2**, we described an alternative use of this assay. Prior to performance of an adapted LLNA with a well known sensitizer, the mice were fed the immunosuppressive compounds bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO), cyclosporin A (CsA), or benzo[a]pyrene (B[a]P) during 28 days, and the effect on lymphocyte proliferation was evaluated to assess effects on immune reactivity. In addition, release of Th1- and Th2-related cytokines by the LN cells was monitored, so as to gain insight into effects of the compounds administered on the Th1/Th2 balance. Both LN cell proliferation and IL-4 and IFN- $\gamma$  release were suppressed by all compounds, indicating immunosuppression. Comparison of the levels of both cytokines showed that TBTO caused a shift towards Th2- and CsA and B[a]P towards Th1-dependent immunity, which may be of relevance regarding modulation of allergic or autoimmune responses. It was concluded that the immune function assay adapted from the LLNA is applicable for demonstration of immunosuppressive effects of orally administered toxicants, especially at highly effective allergen dose levels. The results of the study reported in **Chapter 2** also served to demonstrate and mutually compare the level of immunosuppression by the immunotoxicants that were studied by gene expression profiling, since the same dose levels were used in subsequent experiments that are described in **Chapter 3** and **Chapter 5**.

## Summary and general discussion

### *Detection of immunotoxic effects by gene expression profiling*

In order to establish the ability of gene expression profiling to reveal immunotoxic effects and to generate mechanistic information, transcriptional changes after administration of the immunosuppressive dose level of TBTO to mice for 3, 7, and 14 days were first examined in the thymus, which is the primary target organ for this compound. TBTO exposure resulted in thymic atrophy, and microarray analysis revealed reduced expression of cell surface determinants and receptors and inhibition of cell cycle-related processes, pointing to interference with T cell activation and inhibition of proliferation as a primary mechanism of action of TBTO. Some processes found to be affected by TBTO in this study (e.g. protein biosynthesis) were reported to be interrupted by TBTO previously, while other had not been reported before. An example of the latter was stimulation of mitochondrial functioning and substrate metabolism, which may be a compensatory response to mitochondrial damage or to stress. Several nuclear receptors that may be involved in the effects on lipid metabolism were identified.

A similar experiment was performed in rats, where a somewhat lower dose that nevertheless induced thymus involution hardly caused gene expression changes in the thymus as well as the spleen. In the liver of these animals down-regulation of lipid synthesis was detected. The differences between the results of the two experiments, which were the subject of **Chapter 3**, were ascribed to dose or interspecies differences.

### *Detection of immunotoxic effects by gene expression profiling in vitro*

Since hardly any gene expression changes induced by TBTO were detected in rat thymuses, thymocytes were exposed to (non)cytotoxic doses of TBTO directly in the *in vitro* approach described in **Chapter 4**. Several clues to mechanisms of action were obtained by this approach. Regulation of lipid metabolism by TBTO appeared at a low dose that did not yet result in disruption of cell functioning, and higher doses caused regulation of apoptotic processes, even before this could be observed phenotypically. Indications were obtained that effects on apoptosis may be mediated by modulation of glucocorticoid signaling. The highest dose level tested additionally repressed mitochondrial functioning and immune cell activation. Several results corresponded to previous findings, but in contrast to the conclusion of **Chapter 3** and of previous *in vivo* and *in vitro* studies that inhibition of cell proliferation was the primary mechanisms of action of TBTO, apoptosis appeared to mediate TBTO's toxic effects in our *in vitro* study. The discrepancy between these results is most likely a result of differences in the experimental setup (*in vitro* vs. *in vivo*, duration of exposure to TBTO).

### *Detection of overlapping gene expression profiles of immunotoxicants*

After the observation that immunotoxic effects of TBTO could be demonstrated by microarray analysis in its target organ (**Chapter 3** and **Chapter 4**), a next step was to find overlapping transcriptional effects of a range of immunosuppressive compounds that may eventually be of use for development of screening systems for identification of immunotoxic effects of chemicals. In **Chapter 5** it is described how we assessed gene

expression profiles in the spleen of mice exposed to TBTO, CsA, B[a]P, and acetaminophen (APAP). Several compound-specific and overlapping effects were detected. TBTO for instance interrupted cellular respiration, and CsA and B[a]P inhibited immunological processes. All compounds induced xenobiotic metabolism, and the most significantly affected process for all toxicants was cell division (as was detected for TBTO in the thymus as well, see **Chapter 3**). Highly proliferating immune cells will be particularly sensitive to the latter effect, and evaluation of cell proliferation thus remains a valuable tool to assess immunosuppression. APAP is not an immunotoxic model compound, but since some evidence on immunomodulation by APAP has been published, the consequences of exposure to this compound were compared to those of the other toxicants. Since APAP exposure caused transcriptional effects overlapping with those of the model compounds, resulted in decreased spleen size in absence of reduction of body weight gain, and moreover caused a level of suppression of immune reactivity in the immune function assay adapted from the LLNA comparable to the other compounds (**Chapter 2**), it was concluded that APAP possesses immunosuppressive properties at the dose levels used which appear to be mediated by cell cycle arrest.

### *Evaluation of immunomodulating effects of a probiotic bacterium*

To confirm and further investigate modulation of Th1 responses and development of autoimmune disease by *Lactobacillus casei* Shirota (LcS), we examined the immunomodulatory capacity of this probiotic bacterium in several assays, among which was gene expression profiling as a new approach. **Chapter 6** deals with the results of these studies. The nature of the immunomodulation caused by LcS was determined by the model used. No modulation was detected in mitogen responsiveness and cytokine release assays. LcS inhibited the Th1-mediated immune response in the LLNA applied as an immune function assay, but aggravated Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). These varying effects on Th1 responses indicate that beneficial as well as harmful effects on immune-related disorders may occur after LcS consumption. Gene expression profiles in mesenteric lymph nodes, spleen, thymus, and liver did not reflect the immunomodulation by LcS. The reason for this could be that the immunomodulating effects of the probiotic were only subtle, or, as effects were found in the autoimmunity model, T cell triggering may be a prerequisite for induction of effects by LcS. Alternatively, probiotics may exert their immunomodulating effects at the protein instead of the gene expression level.

### General discussion

The research described in this thesis focused at identification of immunotoxicity by means of gene expression profiling. The occurrence of functional effects of all investigated compounds on immune responsiveness was demonstrated using an immune function assay that was adapted from the LLNA. The usefulness of this assay for indicating immunosuppression was demonstrated in several chapters.

The results of the microarray studies performed using the immunomodulating compounds illustrate several issues raised by previous toxicogenomics studies. The effect of duration of exposure on gene expression profiles was for instance demonstrated in the *in vitro* study, in which induction of apoptosis by TBTO appeared to precede inhibition of cell proliferation, since the latter was the main finding after longer exposure periods in previous *in vitro* studies and our own *in vivo* study. The impact of the dose level on microarray results was illustrated by the experiments in mice and rats. Administration of a high dose of TBTO to mice resulted in significant regulation of gene expression whereas absence of overt gene expression changes was found in rat thymus after exposure to a somewhat lower dose. The impression that high dose levels are needed to induce differential gene expression was supported by the experiments in murine spleen, where even maximum tolerated dose levels of CsA and B[a]P did not induce significant regulation of individual genes. Regulation of cellular pathways relevant for their mechanism of action was however detected by group wise Gene Ontology analysis, which proved to be a powerful tool for identification of relatively subtle transcriptional effects.

Our results do not support the assumption that microarray analysis, at least when using the microarray platforms applied in our studies, is able to demonstrate toxic effects at lower dose levels than traditional methods to study toxicity. Although the differences in results of microarray analyses in murine and rat thymuses might reflect differences in species instead of or in addition to dose, thymus atrophy, which is a sensitive marker of immunotoxicity, was observed in rats whereas regulation of gene transcription was relatively absent. LcS exposure also failed to induce significant effects on gene expression although immunomodulation was detected in other assays. Gene expression profiling is also suggested to be more sensitive than other test methods in terms of duration of exposure. Some effects of TBTO, CsA, B[a]P, and APAP on gene expression indeed appeared before effects on organ weight or histology were observed. In the *in vitro* experiment, we clearly detected induction of apoptosis by TBTO before this could be detected phenotypically. However, pro- as well as anti-apoptotic processes were stimulated by TBTO. Hence, changes in expression of genes mediating a certain process do not necessarily all point to the same direction. In addition, often not all genes taking part in a certain pathway are regulated. Moreover, compounds can exert effects that are not detected at the transcriptional level. TBTO is for example known to affect cell membranes, the cytoskeleton, and protein phosphorylation, and effects of probiotic bacteria on immune cells may also take place at the protein level. Finally, it is possible that induction of an immune response is required for probiotics or other immunomodulators to exert their effects, rendering immune function assays more suitable for detection of effects. Overall, gene expression profiling may not always provide decisive answers on the occurrence of (immuno)toxic events, but does have the capacity to reveal effects at early time points.

An aspect that may complicate the interpretation of microarray results is that changes in cell populations may affect gene expression profiles that are revealed by microarray analysis. TBTO is for instance known to be particularly toxic for rapidly dividing cortical thymocytes. At a certain time point after the start of the exposure, these cells (and their transcriptomes) may have been removed from the cell population in the thymus *in vivo*, whereas they might be cleared less efficiently *in vitro*. In our *in vitro* experiment, the simultaneous detection of pro- and anti-apoptotic processes may be explained by the occurrence of different events in different subpopulations of cells. When assessing effects in the spleen, influx of cells via the blood (possibly as a result of xenobiotic exposure) may influence gene expression profiles. In addition, different compounds may affect different cell types in this organ, which may complicate comparison of effects of xenobiotics. For evaluation of mechanisms of action, comparison of gene expression changes with effects detected by other test methods is therefore important. When compounds are screened for immunotoxic effects, however, most important is that effects of the toxicants are eventually represented in the overall gene expression profile. In all cases mentioned above we were able to uncover effects of the compounds through assessment of gene expression changes.

Toxicogenomics assesses genome wide changes in gene expression and is therefore expected to provide insight into mechanisms of actions of xenobiotics. We performed *in vivo* and *in vitro* studies to elucidate the mechanisms of action of TBTO. Several known effects of TBTO, such as interference with mitochondrial functioning and protein synthesis, were detected by microarray analysis. Whether TBTO primarily causes inhibition of cell proliferation or induction of apoptosis has been a matter of debate for a long time. Whereas we detected the former in thymus and spleen in our *in vivo* experiments in mice, the latter was the main effect of TBTO in rat thymocytes *in vitro*. Although this discrepancy might reflect a species difference, inhibition of cell proliferation by TBTO has previously been detected in rats as well. We therefore hypothesize that induction of apoptosis is an effect of TBTO that precedes inhibition of proliferation in time. Additional experiments examining effects *in vivo* at earlier time points and *in vitro* in murine thymocytes need to be performed to confirm this theory. Other new mechanistic information generated by the microarray analyses was for instance the reduction of expression of cell surface determinants, the possible involvement of glucocorticoid receptor signaling in apoptotic effects of TBTO, and the regulation of lipid metabolism through nuclear receptors. These effects and their functional implications should also be investigated in future experiments. APAP was another compound for which the immunotoxicogenomics approach generated new insights into its mechanism of action. Indications of immunomodulating properties that had appeared in the literature and were detected by the immune function assay adapted from the LLNA and by reduction of spleen size in absence of general toxicity, were confirmed by identification of overlap of the gene expression profile of APAP with that of model immunotoxicants. Since the immune system may possess reserve capacity and compensatory mechanisms and the extent of a change in gene expression does not necessarily correspond to a functional effect of similar size, the clinical implications of these findings should be further investigated.

Another promise of toxicogenomics is that it will contribute to the development of screening assays by identifying signature gene expression profiles for specific classes of compounds. We tested this assumption by comparing gene expression profiles of several



## Summary and general discussion

immunotoxicants. Induction of cell cycle arrest appeared to be a shared effect (even though the mechanism by which this was accomplished may differ between the compounds), and several genes were identified that might be of use as biomarkers for immunosuppression. This experiment thus illustrates the usefulness of evaluating effects of xenobiotics on cell proliferation, which is part of current immunotoxicity testing. Obviously, the specificity and predictivity of inhibition of cell proliferation for immunotoxicity in general should be confirmed by testing a larger range of compounds. Patterson et al. [2] examined gene expression changes induced by the prototype immunosuppressive agents CsA, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), cyclophosphamide, and dexamethason in murine thymus (that involuted after toxicant exposure) and spleen. Preliminary data showed that although most transcriptional effects were compound-specific, some genes were regulated by all compounds. These genes were mainly involved in apoptosis, antigen presentation and processing, and immune cell activation and proliferation. No overlap in individual genes was found between this study and our study, but this may be due to the limited amount of genes that was published by Patterson et al. and that was present on their microarray [2]. Since in this study as well as our own study only immunosuppressive compounds were included, the value of cell proliferation as a biomarker in other areas of immunotoxicology such as sensitization and autoimmunity should still be investigated. Our microarray study also showed that the spleen is a suitable organ for detection of immunosuppression by gene expression profiling. Since effects in this organ are presumably reflected in peripheral lymphocytes that can easily be obtained from blood, this is a valuable finding with respect to development of screening assays. Future evaluation of gene expression profiles in human cells will elucidate the relevance of our findings for the human situation. Since effects of xenobiotics *in vitro* may differ intrinsically from effects *in vivo*, and *in vitro* systems often do not represent the diversity of cell types that is present in the immune system, the relevance of results obtained *in vitro* for the *in vivo* situation and the possibility to use *in vitro* assays for prediction of immunotoxic effects should first be further explored.

Several of the issues mentioned above were also discussed in a workshop addressing the application of toxicogenomics in immunotoxicity screening and in a recent review on this topic [1,3].

## Conclusion

From the results presented in this thesis it can be concluded that examination of immunotoxic effects of compounds by means of gene expression profiling should involve several dose levels and exposure periods. Immunotoxicogenomics appears not to be more sensitive than traditional methods to study immunotoxicity in terms of dose levels needed to reveal effects, but is able to demonstrate immunosuppressive effects at an early time point. Inhibition of cell proliferation was found to be a common effect of a set of immunosuppressive model compounds. Since additional compounds need to be evaluated and *in vitro* test systems for (pre-)screening for immunotoxicity need to be further elaborated, toxicogenomics may not yet be able to replace the current methods for assessment of immunotoxicity. It is a valuable tool for broadening the mechanistic understanding of immunotoxicity, though, and offers opportunities for hazard identification of existing and novel compounds.

## References

1. Burns-Naas, L.A., Dearman, R.J., Germolec, D.R., Kaminski, N.E., Kimber, I., Ladics, G.S., Luebke, R.W., Pfau, J.C., Pruetz, S.B. (2006) 'Omics' technologies and the immune system. *Tox Mech Methods* 16, 101-119.
2. Patterson, R.M., Germolec, D.R. (2006) Gene expression alterations in immune system pathways following exposure to immunosuppressive chemicals. *Ann N Y Acad Sci* 1076, 718-727.
3. Luebke, R.W., Holsapple, M.P., Ladics, G.S., Luster, M.I., Selgrade, M., Smialowicz, R.J., Woolhiser, M.R., Germolec, D.R. (2006) Immunotoxicogenomics: the potential of genomics technology in the immunotoxicity risk assessment process. *Toxicol Sci* 94, 22-27.



# **S**amenvatting en discussie

### Samenvatting

Microarray-analyse wordt gebruikt om de activiteit (ofwel transcriptie of expressie) van vele duizenden genen tegelijk in onderzoeksmateriaal te meten, en bewerkstelligt op deze manier verdieping en verbreding van de kennis omtrent biologische processen. De toepassing van deze techniek voor het bestuderen van ongewenste effecten van lichaamsvreemde stoffen (xenobiotica) in blootgestelde organismen of cellen wordt ook wel 'toxicogenomics' genoemd. Schadelijke gevolgen van interacties van stoffen met het afweersysteem (immunotoxiciteit) worden van oudsher onderzocht door middel van bestudering van veranderingen in gewicht van relevante organen, histopathologie (microscopische studie van ziekteprocessen) van immunologisch weefsel, en immuunfunctietesten. Analyse van genexpressieprofielen is een relatief nieuwe methode om immunotoxiciteit te bestuderen. Voorbeelden van 'immunotoxicogenomics' studies die verschenen zijn in de wetenschappelijke literatuur (**Hoofdstuk 1** en [1]) hebben laten zien dat microarray-analyse in staat is bekende en tot dusver onbekende effecten van een breed scala aan immuunmodulerende verbindingen aan te tonen. Deze studies hebben echter ook aangetoond dat de dosis, blootstellingsduur, en het aantal genen dat wordt onderzocht van grote invloed kunnen zijn op de uitkomst van microarray-analyses. Ook geven ze het belang aan van het koppelen van genexpressiegegevens aan pathologische en functionele eindpunten voor correcte interpretatie van de gegevens. Naast het ophelderen van werkingsmechanismen van toxische agentia kan toxicogenomics ook de respons van biologische systemen op blootstelling aan deze verbindingen voorspellen. Succesvolle pogingen om stoffen te classificeren op basis van genexpressiegegevens die overeenkomen met profielen die specifiek zijn gebleken voor een bepaald effect zijn al gerapporteerd buiten het gebied van de immunotoxicologie. Databestanden waarin genexpressieprofielen behorend bij een biologisch proces of effect zijn opgeslagen, kunnen dergelijke toepassingen van toxicogenomics bevorderen. Methoden en technische details van microarray-analyse kunnen echter variëren, wat het verzamelen en vergelijken van gegevens afkomstig van verschillende laboratoria kan bemoeilijken. Om die reden wordt veel aandacht besteed aan standaardisering van het genereren, rapporteren en beheren van genexpressiedata. Ondanks het feit dat voor het toepassen van toxicogenomics voor bestudering van immunotoxiciteit dus nog hindernissen zullen moeten worden overwonnen, draagt deze onderzoeksmethode al bij aan het begrip van immunotoxische processen en de ontwikkeling van *in vitro* ('in glas', ofwel buiten het organisme) testmethoden. De verwachting is daarom dat toxicogenomics waardevol zal blijken voor het verkrijgen van inzicht in werkingsmechanismen van immuunmodulerende verbindingen en voor het beoordelen van de schadelijke uitwerking van bestaande stoffen en stoffen met een nog onbekend effect. Deze aannamen werden getoetst in een reeks van experimenten die de bruikbaarheid van genexpressieprofilering voor het identificeren van immunotoxische processen onderzochten. De voornaamste bevindingen van deze studies worden hieronder samengevat.

### *Het gebruik van de LLNA als immuunfunctietest*

De 'Local Lymph Node Assay' (LLNA), die in de muis wordt uitgevoerd, werd oorspronkelijk ontwikkeld om het vermogen van stoffen om een allergische reactie teweeg te brengen te beoordelen. De respons (namelijk verhoogde celdeling ofwel proliferatie) van immuuncellen (lymfocyten) in lymfeklieren na het aanbrengen van een verbinding op de huid is dan een maat voor het vermogen van een stof om allergie te induceren. In **Hoofdstuk 2** is een alternatieve toepassing van deze test beschreven. Voordat een aangepaste LLNA met een bekende allergene verbinding werd uitgevoerd, werd aan de muizen de immuunsuppressieve verbindingen bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO), cyclosporine A (CsA) of benzo[a]pyreen (B[a]P) toegediend gedurende 28 dagen. De effecten van deze stoffen op de proliferatieve respons van lymfocyten op het allergeen waren nu een maat voor hun effecten op de immuunrespons. Daarnaast werd de uitscheiding van cytokines (eiwitten die een signaal doorgeven en cellulaire processen in gang kunnen zetten) die verband houden met een Th1 of Th2 type immuunrespons gemeten, met als doel inzicht te verkrijgen in effecten van de toegediende agentia op de Th1/Th2 balans. Zowel de proliferatie van lymfekliercellen als de uitscheiding van de cytokines IL-4 en IFN- $\gamma$  werden onderdrukt door alle stoffen, wat wijst op immuunsuppressie. Een vergelijking van de niveaus van beide cytokines liet zien dat TBTO een verschuiving richting Th2- en CsA en B[a]P richting Th1-gemedieerde immuniteit veroorzaakten. Dit zou een weerslag kunnen hebben op ontwikkeling van allergie en autoimmuniteit. Uit deze studie werd geconcludeerd dat de immuunfunctietest afgeleid van de LLNA bruikbaar is voor het aantonen van onderdrukking van de immuunrespons door oraal toegediende agentia, met name bij hoge allergeendoseringen. De resultaten lieten tevens de mate van immuunsuppressie door de verschillende verbindingen zien, wat van belang was voor de experimenten die beschreven zijn in **Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 5**, waarin dezelfde doseringen als gebruikt in **Hoofdstuk 2** toegepast werden.

### *Aantonen van immunotoxische effecten met behulp van genexpressie-analyse*

Om inzicht te krijgen in de potentie van genexpressieprofielering om immunotoxische effecten aan te tonen en mechanistische informatie te genereren, werden veranderingen in transcriptie van genen na blootstelling van muizen aan een immuunsuppressieve dosis TBTO gedurende 3, 7 of 14 dagen bestudeerd in de thymus, het voornaamste doelwit orgaan van deze verbinding. TBTO blootstelling resulteerde in atrofie (afname van weefselmassa) van de thymus, en microarray-analyse gaf een verminderde expressie van genen die coderen voor moleculen en receptoren op het oppervlak van immuuncellen en remming van processen die in verband staan met celdeling aan. Deze resultaten duiden op verstoring van T cel activatie en remming van lymfocytoproliferatie als belangrijkste werkingsmechanisme van TBTO. Sommige effecten van TBTO op cellulaire processen die in deze studie gevonden werden (bv. verstoring van eiwit productie) waren al eerder beschreven in de literatuur, andere nog niet. Een voorbeeld van dit laatste was stimulering van processen die in mitochondriën (celcompartimenten verantwoordelijk voor energieproductie) plaatsvinden en van substraatmetabolisme. Dit wijst mogelijk op een adaptieve respons op mitochondriële schade of cellulaire stress. De effecten op

## *Samenvatting en discussie*

vetmetabolisme werden mogelijk gemedieerd door diverse kernreceptoren waarvan de expressie veranderde door blootstelling aan TBTO.

Een vergelijkbaar experiment werd uitgevoerd in ratten. Een lagere dosis die desalniettemin thymusatrofie veroorzaakte, resulteerde hier nauwelijks in genexpressieveranderingen in de thymus en de milt. In de lever van de ratten werd remming van vetsynthese gedetecteerd. De verschillen tussen de resultaten van deze studie en die in de muis, beide beschreven in **Hoofdstuk 3**, werden toegeschreven aan het verschil in toegediende dosis of soort-specifieke effecten.

### *Aantonen van immunotoxiciteit met behulp van genexpressie-analyse in vitro*

Aangezien er nauwelijks effecten van TBTO op genexpressie werden gevonden in de rattenthymus, werden in het experiment beschreven in **Hoofdstuk 4** primaire thymocyten (cellen die rechtstreeks uit de thymus verkregen zijn) direct blootgesteld aan verschillende doseringen van TBTO *in vitro*. Op deze manier werden verschillende aanwijzingen voor het werkingsmechanisme van TBTO gevonden. Een effect op vetmetabolisme werd gevonden bij een lage dosis die nog geen meetbaar effect op celfunctioneren had, en hogere doseringen leidden tot regulatie van apoptose (geprogrammeerde celdood), zelfs al voordat dit fenotypisch zichtbaar werd. De resultaten suggereerden een mogelijke rol van de glucocorticoïdereceptor in de effecten van TBTO op apoptose. De hoogste dosering die werd bestudeerd, onderdrukte daarnaast het functioneren van mitochondriën en immuuncelactivatie. Verschillende resultaten waren in overeenstemming met eerder gerapporteerde bevindingen, maar in tegenstelling tot de conclusie van **Hoofdstuk 3** en van eerdere *in vitro* en *in vivo* studies dat remming van celproliferatie het voornaamste werkingsmechanisme van TBTO zou zijn, leek in deze studie met name apoptose het toxische effect van TBTO te mediëren. Deze tegenstrijdigheid komt hoogst waarschijnlijk voort uit verschillen in opzet van de studies (*in vitro* vs. *in vivo*, blootstellingsduur).

### *Overlappende genexpressieprofielen van immunotoxische verbindingen*

Nadat geconstateerd was dat immunotoxische effecten van TBTO zichtbaar konden worden gemaakt door middel van microarray-analyse in het doelwit orgaan (**Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 4**), was een volgende stap het vinden van gemeenschappelijke effecten van een reeks immuunsuppressieve model verbindingen op gentranscriptie, die uiteindelijk bruikbaar zouden kunnen zijn voor het ontwikkelen van testsystemen voor het identificeren van immunotoxische eigenschappen van stoffen met een nog onbekend effect. In **Hoofdstuk 5** wordt beschreven hoe genexpressieprofielen werden bepaald in de milt van muizen die bloot werden gesteld aan TBTO, CsA, B[a]P en paracetamol (APAP). Diverse stof-specifieke en collectieve effecten werden waargenomen. Zo verstoorde TBTO bijvoorbeeld de ademhalingsketen in mitochondriën, en CsA en B[a]P remden verschillende immunologische processen. Alle stoffen induceerden enzymen betrokken bij het metabolisme van xenobiotica. Het meest significant aangetaste proces was voor alle stoffen celdeling (zoals voor TBTO ook in de thymus werd gevonden in **Hoofdstuk 3**). Snel delende immuuncellen zullen in hoge mate gevoelig zijn voor dit laatste effect, en het

meten van celproliferatie blijft dus een belangrijke methode om immuunsuppressie aan te tonen.

Paracetamol is geen prototype immuunsuppressieve verbinding, maar omdat eerder onderzoek aanwijzingen opleverde dat paracetamol immuunmodulerende eigenschappen zou kunnen bezitten, werden de effecten van deze stof vergeleken met die van de andere agentia. Blootstelling aan paracetamol leidde tot effecten op gentranscriptie die gedeeltelijk overlap vertoonden met die van de model verbindingen, resulteerde in afname van de grootte van de milt zonder dat effecten op lichaamsgewicht werden waargenomen, en veroorzaakte bovendien een mate van suppressie van de immuunrespons in de immuunfunctietest die afgeleid werd van de LLNA overeenkomstig met de andere stoffen (**Hoofdstuk 2**). Hierdoor werd geconcludeerd dat paracetamol in de dosering die gebruikt werd in deze studie in staat is het immuunsysteem te onderdrukken en dat dit plaats lijkt te vinden door middel van het stopzetten van de celcyclus.

### *Bestudering van immuunmodulerende effecten van een probioticum*

Om de effecten van *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) op Th1 type immuunresponsen en het ontstaan van autoimmuunziekten te bevestigen en verder te onderzoeken, werden de immuunmodulerende eigenschappen van dit probioticum (een micro-organisme dat de darmflora van de gastheer verandert en waarvan een gezondheidsbevorderend effect wordt verwacht) onderzocht met behulp van diverse analyses, waaronder genexpressieprofielering als een nieuwe benadering. **Hoofdstuk 6** beschrijft de resultaten van deze studies. De aard van de immuunmodulatie door LcS werd bepaald door het experimentele model dat werd gebruikt. In analyses van de respons van lymfocyten op LcS (proliferatie en cytokine uitscheiding) werd geen effect gemeten. LcS remde de Th1-gemedieerde immuunrespons in de immuunfunctietest die afgeleid werd van de LLNA, maar verergerde Experimentele Autoimmuun Encephalomyelitis (EAE). Deze wisselende effecten op Th1 responsen wijzen erop dat zowel gunstige als schadelijke effecten op immuun-gerelateerde aandoeningen zouden kunnen optreden na LcS consumptie. Genexpressieprofielen in mesenteriale lymfeklieren, milt, thymus en lever gaven de immunomodulatie door LcS die in de andere analyses werd gedetecteerd niet weer. De reden hiervoor zou kunnen zijn dat de effecten van het probioticum op het immuunsysteem slechts subtiel waren, of, aangezien wel effecten werden gevonden in het autoimmuunmodel, dat T cel activatie nodig is alvorens LcS immuunmodulatie kan bewerkstelligen. Een andere verklaring kan zijn dat effecten van LcS voornamelijk plaatsvinden op eiwit en niet op genexpressie niveau.



### Discussie

Het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift was gericht op het aantonen van immunotoxiciteit door middel van genexpressieprofilering. Het effect van alle gebruikte stoffen op immuunfunctie werd bestudeerd met behulp van een immuunfunctietest die werd afgeleid van de LLNA. De bruikbaarheid van deze methode voor het aanduiden van immuunsuppressieve effecten werd in diverse hoofdstukken bewezen.

De microarray-analyses die werden uitgevoerd voor de immuunmodulerende agentia brachten verschillende zaken naar voren die ook in eerdere toxicogenomics studies werden opgemerkt. De invloed van blootstellingsduur op het genexpressieprofiel werd bijvoorbeeld zichtbaar in de *in vitro* studie, waarin het induceren van apoptose vooraf leek te gaan aan remming van celdeling, het meest prominente effect van TBTO na langdurigere blootstelling *in vitro* in eerdere studies en in onze eigen *in vivo* studie. Het effect van de toegediende dosering op microarrayresultaten werd gedemonstreerd in de studies in muis en rat. Toediening van een hoge dosis TBTO aan muizen had significante genexpressieveranderingen tot gevolg, terwijl duidelijke regulatie van genexpressie afwezig was in de thymus van ratten die blootgesteld waren aan een lagere dosis. De indruk dat hoge doseringen vereist zijn om genexpressieprofielen te beïnvloeden, werd ondersteund door de experimenten in de milten van de muizen. Daar resulteerden maximaal tolereerbare doseringen van CsA en B[a]P niet in significante regulatie van individuele genen. Een analyse waarbij naar groepsgewijze veranderingen van genen binnen een functionele categorie werd gekeken, toonde echter wel regulatie van cellulaire processen die relevant zijn voor het werkingsmechanisme van deze stoffen aan, en is dus een sterk middel om relatief subtiele effecten op genexpressie te detecteren.

De uitkomsten van het beschreven onderzoek ondersteunen de aanname dat microarray-analyse schadelijke effecten kan aantonen bij lagere doseringen dan methoden die van oudsher in de toxicologie worden gebruikt niet. De verschillen tussen de resultaten van de muizen- en rattenstudies zouden theoretisch ook veroorzaakt kunnen worden door soort-specifieke effecten in plaats van of naast verschillen in gebruikte doseringen, maar aangezien enige mate van atrofie van de thymus (een gevoelige indicator voor immunotoxiciteit) wel werd waargenomen in ratten terwijl regulatie van de genexpressie nauwelijks optrad, wijst eerder op een dosis-gerelateerd effect. LcS blootstelling induceerde eveneens geen significante veranderingen van gentranscriptie terwijl modulatie van immuunresponsen wel werd waargenomen met behulp van meer traditionele testmethoden. Aan genexpressieprofilering wordt ook een grotere gevoeligheid ten opzichte van andere analyses met betrekking tot blootstellingsduur toegedicht. Sommige effecten van TBTO, CsA, B[a]P en paracetamol op genexpressie waren inderdaad waarneembaar voordat effecten op orgaangewicht of histologie werden gevonden. In het *in vitro* experiment was inductie van apoptose door TBTO eerder te observeren op genexpressie niveau dan fenotypisch. Wel werden zowel apoptosis-stimulerende als -remmende processen in gang gezet. Veranderingen in expressie van genen die een rol spelen in een bepaald proces hoeven dus niet per definitie allemaal in dezelfde richting te wijzen. Daarnaast worden vaak niet alle genen die onderdeel zijn van een specifieke cellulaire cascade op een zelfde moment gereguleerd. Bovendien kunnen stoffen effecten bewerkstelligen die niet op het niveau van gentranscriptie waarneembaar zijn. Van TBTO is bijvoorbeeld bekend dat het celmembranen, het celskelet en

eiwitfosforylering aantast, en ook effecten van probiotica op het immuunsysteem zouden met name op eiwit niveau kunnen plaatsvinden. Ten slotte is het ook mogelijk dat probiotica of andere immuunmodulerende agentia pas een uitwerking kunnen hebben op het immuunsysteem wanneer een immuunrespons op gang is gebracht. In dat geval zouden immuunfunctietesten meer geschikt zijn voor het aantonen van immuunmodulerende effecten. Over het algemeen zullen genexpressieprofielen mogelijk niet altijd uitsluitend kunnen geven over het al dan niet optreden van een (immuno)toxisch effect, maar hebben ze wel de potentie om effecten op een vroeg moment te onthullen.

De interpretatie van resultaten van microarray studies kan bemoeilijkt worden door het effect van veranderingen in celpopulaties op het genexpressieprofiel. Snel delende thymocyten in de cortex van de thymus zijn bijvoorbeeld extra gevoelig voor effecten van TBTO. Op enig moment na aanvang van de blootstelling kan deze celpopulatie met het bijbehorende genexpressieprofiel *in vivo* uit de thymus verdwenen zijn, terwijl deze cellen *in vitro* mogelijk minder efficiënt verwijderd kunnen worden. In het *in vitro* experiment dat is beschreven in dit proefschrift zou de gelijktijdige waarneming van apoptose-stimulerende en -remmende processen verklaard kunnen worden door het optreden van verschillende effecten in verschillende subpopulaties van cellen. Wanneer genexpressie wordt bestudeerd in de milt kan instroom van cellen via het bloed, mogelijk als gevolg van blootstelling aan xenobiotica, van invloed zijn op de bevindingen. Bovendien kunnen verschillende stoffen verschillende celtypen die aanwezig zijn in dit orgaan als doelwit hebben. Bij onderzoek naar werkingsmechanismen is het daarom van belang dat waargenomen genexpressieveranderingen naast effecten die door middel van andere analyses worden waargenomen gelegd worden. Wanneer verbindingen worden gecontroleerd op mogelijke immunotoxische eigenschappen is het echter voornamelijk van belang dat toxische effecten uiteindelijk af te leiden zijn uit het totale genexpressieprofiel. In alle hierboven genoemde gevallen was het mogelijk om effecten van de stoffen te detecteren door middel van microarray-analyse.

Met behulp van toxicogenomics kan de respons van het complete genoom op blootstelling aan xenobiotica in kaart gebracht worden. De verwachting is daarom dat deze onderzoeksmethode uitbreiding van kennis omtrent werkingsmechanismen van toxische stoffen zal opleveren. In dit proefschrift zijn *in vivo* en *in vitro* studies beschreven die het werkingsmechanisme van TBTO bestudeerden. Verschillende bekende effecten van TBTO, zoals verstoring van het functioneren van mitochondriën en van eiwitsynthese, werden door microarray-analyse gedetecteerd. Of TBTO hoofdzakelijk celdeling remt of apoptose induceert is een reeds lang bestaand discussiepunt. Terwijl het eerste effect werd waargenomen in de thymus in muizen, was het laatste het voornaamste effect van TBTO in rattenthymocyten *in vitro*. Hoewel soort-specifieke effecten hier een rol zouden kunnen spelen, werd remming van celproliferatie eerder ook in ratten waargenomen. Het is daarom waarschijnlijk dat het aanzetten van cellen tot apoptose een effect van TBTO is dat voorafgaat aan het stopzetten van de celcyclus. Aanvullende experimenten die effecten *in vivo* op een vroeger tijdstip en *in vitro* in muizenthymocyten bestuderen, zijn nodig om deze theorie te kunnen bevestigen. Andere nieuwe mechanistische informatie die aan het licht werd gebracht door de microarray-analyses was bijvoorbeeld de verminderde expressie van oppervlakte moleculen op immuuncellen, de mogelijke rol van de glucocorticoïdereceptor signaleringscascade in effecten van TBTO op apoptose en de regulatie van vetmetabolisme via veranderde expressie van kernreceptoren. Ook deze

## Samenvatting en discussie

effecten en hun functionele uitwerking zullen moeten worden bevestigd in nieuwe studies. Paracetamol is een andere stof waarvoor de immunotoxicogenomics benadering nieuwe inzichten in werkingsmechanismen opleverde. De aanwijzingen voor immuunsuppressieve eigenschappen van paracetamol die eerder verschenen in de wetenschappelijke literatuur en die voortkwamen uit het bestuderen van de miltgrootte en uit de immuunfunctietest afgeleid van de LLNA, werden ondersteund door de overlap in genexpressieveranderingen door deze stof en de immunotoxische modelstoffen. Omdat het immuunsysteem beschikt over reservecapaciteit en compensatiemechanismen en de mate van verandering in genexpressie niet noodzakelijkerwijs overeen hoeft te komen met een functioneel effect van gelijke grootte, moeten de klinische implicaties van deze bevindingen nog verder onderzocht worden.

Een andere belofte van toxicogenomics is dat het door het genereren van genexpressieprofielen die specifiek zijn voor een bepaalde klasse verbindingen bij zal dragen aan de ontwikkeling van testsystemen voor het voorspellen van effecten van verbindingen. Deze aanname werd onderzocht door genexpressieprofielen van meerdere immunotoxische stoffen te vergelijken. Het stopzetten van de celcyclus (zij het mogelijk via verschillende mechanismen) kwam naar voren als een gemeenschappelijk effect van deze stoffen, en genexpressieveranderingen die als indicator voor immuunsuppressie zouden kunnen gelden ('biomarkers') werden geïdentificeerd. Deze studie illustreert de waarde van het bestuderen van effecten van xenobiotica op celdeling, zoals dat ook gebeurt binnen het huidige immunotoxiciteitsonderzoek. Uiteraard zal een grotere reeks verbindingen getest moeten worden om de specificiteit en voorspellende waarde van remming van celproliferatie voor immunotoxiciteit in het algemeen vast te stellen. De onderzoeksgroep van Patterson [2] heeft genexpressieveranderingen in de thymus van muizen blootgesteld aan de immuunsuppressieve modelstoffen CsA, 2,3,7,8-tetrachloordibenzo-*p*-dioxine (TCDD), cyclofosfamide, en dexamethason bestudeerd. Voorlopige analyses lieten zien dat hoewel de meeste genexpressieveranderingen stof-specifiek waren, sommige genen door alle stoffen gereguleerd werden. Deze genen speelden met name een rol in apoptose, antigeenpresentatie en -verwerking, en immuuncelactivatie en -proliferatie. De genen vertonen geen overlap met de genen die geïdentificeerd werden in de hierboven beschreven studie; een reden hiervoor kan zijn dat de gebruikte microarrays een gelimiteerd aantal genen bevatten en dat slechts een deel van de bevindingen tot op heden is gepubliceerd [2]. Aangezien beide studies zich beperkten tot immuunsuppressieve stoffen, zal de bruikbaarheid van het onderzoeken van effecten op celdeling binnen andere gebieden van de immunotoxicologie (zoals sensibilisatie en autoimmuniteit) nog uitgezocht moeten worden. De studie beschreven in Hoofdstuk 5 toonde eveneens aan dat de milt een geschikt orgaan is voor het aantonen van onderdrukking van het immuunsysteem middels genexpressieprofilering. Omdat het aannemelijk is dat effecten in dit orgaan weerspiegeld zullen worden in perifere lymfocyten, die relatief gemakkelijk uit bloed verkregen kunnen worden, is dit een waardevolle bevinding voor wat betreft het ontwikkelen van testmethoden. Toekomstige analyses van genexpressieprofielen in humane cellen zal de relevantie van de bevindingen voor de humane situatie moeten uitwijzen. Aangezien effecten van xenobiotica die worden waargenomen *in vitro* kunnen verschillen van effecten *in vivo*, en *in vitro* testmethoden vaak niet de diversiteit aan celtypen die een rol spelen in het immuunsysteem vertegenwoordigen, zal echter eerst de relevantie van *in vitro* verkregen

resultaten voor de *in vivo* situatie en de mogelijkheid om met behulp van *in vitro* methoden immunotoxische effecten te voorspellen verder onderzocht moeten worden.

Verskillende zaken die hierboven aan bod zijn gekomen werden ook bediscussieerd in een workshop omtrent de toepassing van toxicogenomics voor het opsporen van immunotoxische effecten van xenobiotica en in een recent overzichtsartikel over dit onderwerp [1,3].

### Conclusie

Uit de resultaten die gepresenteerd worden in dit proefschrift kan geconcludeerd worden dat voor het onderzoeken van immunotoxische effecten van verbindingen door middel van bestudering van genexpressieprofielen meerdere doseringen en blootstellingsperiodes nodig zijn. Immunotoxicogenomics lijkt niet gevoeliger dan traditionele methoden om immunotoxiciteit te bestuderen voor wat betreft de doseringen die nodig zijn om effecten aan het licht te brengen, maar maakt wel het aantonen van onderdrukking van het immuunsysteem kort na aanvang van de blootstelling mogelijk. Remming van celproliferatie kwam naar voren als een gemeenschappelijk effect van een serie immuunsuppressieve modelverbindingen. Aangezien een breder scala aan stoffen onderzocht moet worden en *in vitro* testsystemen voor het beoordelen van effecten van xenobiotica verder verfijnd moeten worden, zal toxicogenomics op dit moment de huidige methoden voor het bestuderen van immunotoxiciteit nog niet kunnen vervangen. Het is echter een waardevol middel om inzicht in werkingsmechanismen uit te breiden en biedt mogelijkheden voor het identificeren van ongewenst effecten van stoffen met nog (gedeeltelijk) onbekende effecten.

### Referenties

1. Burns-Naas, L.A., Dearman, R.J., Germolec, D.R., Kaminski, N.E., Kimber, I., Ladics, G.S., Luebke, R.W., Pfau, J.C., Pruett, S.B. (2006) 'Omics' technologies and the immune system. *Tox Mech Methods* 16, 101-119.
2. Patterson, R.M., Germolec, D.R. (2006) Gene expression alterations in immune system pathways following exposure to immunosuppressive chemicals. *Ann N Y Acad Sci* 1076, 718-727.
3. Luebke, R.W., Holsapple, M.P., Ladics, G.S., Luster, M.I., Selgrade, M., Smialowicz, R.J., Woolhiser, M.R., Germolec, D.R. (2006) Immunotoxicogenomics: the potential of genomics technology in the immunotoxicity risk assessment process. *Toxicol Sci* 94, 22-27.

