

# Leveraging Multi-Omics Technologies for Studying the Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Thyroid In Vitro Models

Citation for published version (APA):

Nazzari, M. (2024). *Leveraging Multi-Omics Technologies for Studying the Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Thyroid In Vitro Models*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20240410mn>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2024

**DOI:**

[10.26481/dis.20240410mn](https://doi.org/10.26481/dis.20240410mn)

**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.

# Summary of the Thesis

This thesis contains work performed in the context of SCREENED, a European Union's Horizon 2020 project part of the EURION cluster, aimed at developing new test and screening methods to identify endocrine disrupting chemicals (EDCs). SCREENED focused on the thyroid, an essential endocrine organ understudied within the field of toxicology. Other partners within the project developed a protocol for differentiating thyroid organoids from human and mouse embryonic stem cells (ESC) which were used as an *in vitro* model to test the response to EDCs. Some of these exposure experiments performed during the project are reported in this thesis.

For the bulk transcriptome analyses in Chapters 2 and 3, we employed a relatively new method able to assess simultaneously the mRNA and miRNA expression in a sample called “Combo-Seq”. In **Chapter 2**, we evaluated the robustness of this method and compared it to conventional separate poly(A) and small RNA libraries. Since we observed some limitations and inaccuracies with the pipeline recommended by the kit manufacturer for the analysis of Combo-Seq data, we developed a new one, better adapted to this purpose. In the Chapter, we compared the two pipelines at several steps of data analysis, from data processing to differential expression analysis.

In **Chapter 3**, we exposed mouse ESC-derived thyroid follicles to five incremental, biologically relevant doses of four phthalates for 24 hours and analyzed the changes in the transcriptome via RNA-Sequencing. Gene Set Enrichment Analysis showed a common upregulation of genes involved in fatty acid metabolism by all four phthalates, as well as downregulation of genes involved in signaling by GTPases, tyrosine kinases and TGF $\beta$  family members and extracellular matrix organization. In all treatments we observed an upregulation of *Ing5*, whose protein product is involved in histone acetylation. We then exposed a thyroid cell line for 5 days to a selection of two phthalates to identify any treatment effect on chromatin accessibility, but we did not observe any changes.

In **Chapter 4**, we analyzed the effects of 16 EDCs belonging to four different classes on mouse thyroid organoids by way of transcriptomics and proteomics. We observed dose-response curves for several genes and a few miRNAs and, for some, doses that could represent potential points of departure. We used transcriptomics data to perform differential expression analysis grouping EDCs by class to identify possible class effects and proteomics data to identify proteins differentially expressed after EDC treatment. We combined the two datasets to identify if changes in genes or miRNA expression could be predictive of the protein levels of target proteins and to derive Random Forest classification models to determine whether a sample belongs to any of the EDC classes analyzed.

In **Chapter 5**, we studied if different sex hormones contexts would affect the thyroid model response to EDCs. To this end, we exposed human ESC-derived thyroid follicles to two mixtures of estrogen, progesterone and dihydrotestosterone that would resemble the serum levels of human females and males of reproductive age for three days. Afterwards, we added BAP and PCB153 for 24 hours, and at the end of the exposure period, we performed 10x Genomics single cell RNA-Sequencing. PCB153 had very limited effects on the transcriptome. We observed synergies between BAP and the two hormonal mixes, especially the “male” cocktail, affecting ribosomal genes as well as genes involved in promoting inflammation, lipid transport and metabolism and oxidative phosphorylation. Additionally, the presence of the “female” mixture increased the expression of aryl hydrocarbon receptor targets.

# Samenvatting van het Proefschrift

Dit proefschrift bevat werk dat is uitgevoerd in het kader van SCREENED, een Horizon 2020-project van de Europese Unie dat deel van het EURION-cluster uitmaakt, gericht op de ontwikkeling van nieuwe test- en screeningsmethoden om hormoonverstorende stoffen (in het Engels “endocrine disrupting chemicals” (EDCs) genaamd) te identificeren. SCREENED richtte zich op de schildklier, een essentieel endocrien orgaan dat binnen de toxicologie zeer beperkt bestudeerd is. Andere project partners hebben een protocol ontwikkeld voor de differentiatie van schildklierorganoiden uit menselijke en muizenembryonale stamcellen (ESC). Hiermee kan een *in vitro* cel model gemaakt worden voor het testen van de effecten van EDCs. De resultaten van de blootstellingsexperimenten die tijdens dit project werden uitgevoerd, worden in dit proefschrift gerapporteerd.

Voor de bulk transcriptoom analyses in Hoofdstukken 2 en 3 gebruikten we een relatief nieuwe methode die in staat is om tegelijkertijd de mRNA en miRNA expressie in een monster te bepalen, genaamd "Combo-Seq". In **Hoofdstuk 2** hebben we de robuustheid van deze methode geëvalueerd en vergeleken met conventionele afzonderlijke poly(A) en kleine RNA-bibliotheken. Voor de analyse van deze RNAseq data hebben wij een nieuwe en verbeterde pijplijn gemaakt, omdat de analyse pijplijn van de fabrikant een aantal beperkingen en onnauwkeurigheden vertoonde. In dit hoofdstuk vergeleken we de twee pijplijnen in verschillende stappen van de gegevensanalyse, van gegevensverwerking tot differentiële expressieanalyse.

In **Hoofdstuk 3** stelden we ESC-afgeleide schildklierfollikels van muizen bloot aan vijf oplopende, biologisch relevante doses van vier ftalaten gedurende 24 uur en analyseerden we de veranderingen in het transcriptoom met behulp van RNA-Sequencing. Gene Set Enrichment Analysis toonde een gemeenschappelijke inductie van genen betrokken bij vetzuurmetabolisme door alle vier ftalaten, evenals repressie van genen betrokken bij signalering door GTPases, tyrosinekinases en TGF $\beta$  familieleden en extracellulaire matrixorganisatie. Bij alle blootstellingen zagen we een toename van *Ing5*, waarvan het eiwitproduct betrokken is bij histonacetylering. Vervolgens stelden we een schildkliercellijn gedurende 5 dagen bloot aan een selectie van twee ftalaten om het effect van de behandeling op de chromatinetoegankelijkheid vast te stellen, maar we namen geen veranderingen waar.

In **Hoofdstuk 4** analyseerden we de effecten van 16 EDCs uit vier verschillende klassen op organoiden van de schildklier bij muizen door middel van transcriptomics en proteomics. We observeerden dosis-respons curves voor verschillende genen en een paar miRNAs, en voor

sommige EDCs konden we een dosis vaststellen die als potentiële point of departure kon dienen. We gebruikten transcriptomics gegevens om een differentiële expressieanalyse uit te voeren waarbij EDCs per klasse werden gegroepeerd om mogelijke klasse-effecten te identificeren en proteomics gegevens om eiwitten te identificeren die differentieel tot expressie kwamen na een blootstelling met EDCs. We combineerden de twee datasets om vast te stellen of veranderingen in genen of miRNA expressie voorspellend zouden kunnen zijn voor de eiwitniveaus van doeleiwitten. Daarnaast hebben deze data gebruikt om Random Forest classificatiemodellen af te leiden die gebruikt kunnen worden om EDCs te classificeren.

In **Hoofdstuk 5** onderzochten we of verschillende omgevingscontexten van geslachtshormonen de respons van het schildkliermodel op EDCs zouden beïnvloeden. Hiertoe stelden we menselijke ESC-afgeleide schildklierfollikels gedurende drie dagen bloot aan twee mengsels van oestrogeen, progesteron en dihydrotestosteron die de serumniveaus van menselijke vrouwen en mannen in de reproductieve leeftijd simuleren. Vervolgens voegden we gedurende 24 uur BAP en PCB153 toe, en aan het eind van de blootstellingsperiode voerden we 10x Genomics single cell RNA-Sequencing uit. PCB153 had zeer beperkte effecten op het transcriptoom. We zagen synergieën tussen BAP en de twee hormoonmengsels, vooral de "mannelijke" cocktail, die invloed hadden op ribosomale genen en genen die betrokken zijn bij de bevordering van ontsteking, lipidentransport en -metabolisme en oxidatieve fosforylering. Bovendien verhoogde de aanwezigheid van het "vrouwelijke" mengsel de expressie van arylkoolwaterstofreceptordoeiwitten.