

Evaluation of in vitro immunotoxicity tests using transcriptomics

Citation for published version (APA):

Schmeits, P. C. J. (2015). *Evaluation of in vitro immunotoxicity tests using transcriptomics*. Uitgeverij BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20151113ps>

Document status and date:

Published: 01/01/2015

DOI:

[10.26481/dis.20151113ps](https://doi.org/10.26481/dis.20151113ps)

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.

Chapter 8

Nederlandse samenvatting

In dit proefschrift staan twee hoofdonderwerpen centraal. Ten eerste, het bepalen van de geschiktheid van twee muizen cellijnen (EL-4 en CTLL-2) en één humane cellijn (Jurkat) voor detectie van mechanismes van immunotoxiciteit. Ten tweede, het uitvoeren van een (pre)validatie van biomerkers voor detectie van humane immunotoxiciteit. Daarnaast werd met behulp van microarrays meer inzicht verschaft in het werkingsmechanisme van immunotoxische stoffen. Een overzicht van het immuunsysteem, de huidige testmethoden voor immunotoxiciteit, het werkingsmechanisme van de immunotoxische modelstoffen en een uitleg van verschillende ‘omics’ technologieën wordt gegeven in **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift. Het afgelopen decennium verschoof de aandacht met betrekking tot immunotoxiciteitstesten langzaam richting het gebruik van minder proefdieren. Dit komt onder andere tot uitdrukking in diverse Amerikaanse en Europese richtlijnen en regelgevingen. Parallel aan de introductie van deze richtlijnen en regelgevingen was de opkomst van toxicogenomics technieken, zoals microarrays. Hiermee wordt de respons in boodschapper RNA (mRNA) van het gehele genoom gemeten. Op deze wijze kunnen grote hoeveelheden data verkregen worden uit relatief kleine samples. Deze technieken geven meer inzicht in de werkingsmechanismen van nieuwe en bestaande stoffen en dragen bij aan de identificatie van biomerkers. Ondanks de geboekte vooruitgang met de ontwikkeling van proefdiervrije immunotoxiciteitstesten zoals de lymfocyt proliferatie test en cytokine release test, was de bijdrage van genomics technieken bij de totstandkoming van alternatieve testen beperkt. In dit proefschrift wordt een toxicogenomics benadering gevolgd voor het bepalen van de geschiktheid van verschillende cel modellen als alternatieve testen voor directe immunotoxiciteit. Cel modellen die gebruikt werden betroffen de muizen CTLL-2, muizen EL-4 en humane Jurkat T cellijnen. Verder beschrijft dit proefschrift onderzoek naar het werkingsmechanisme van de immunotoxische stoffen TBTO en DON in de Jurkat cellijn en de geschiktheid van eerder geïdentificeerde biomerkers voor het opsporen van immunotoxiciteit in deze cellijn.

Standaardisering van blootstellingsexperimenten

Een eerste voorwaarde voor een optimale teststrategie is het gebruiken van een methode die in elk experiment hetzelfde is. Omdat elke stof toxiciteit kan veroorzaken zolang de dosis hoog genoeg is, werden in de experimenten in dit proefschrift condities geselecteerd die het mogelijk maken om stof-specifieke effecten te detecteren. Hoge concentraties induceren een algemene cytotoxiciteitsrespons, leidend tot celdood via necrose (door verlies van membraan integriteit resulterend in cel lysis) of apoptose (gecontroleerde celdood). De stof specifieke effecten van een stof zijn dan niet meer te detecteren. Voor elke stof getest in dit proefschrift werden viabiliteitsdata gegenereerd na 24 uur blootstellingen. De criteria voor het selecteren van de concentraties voor microarray blootstellingen werd bepaald op een afname van maximaal 20% in cel viabiliteit na 24 uur. De gekozen concentraties werden vervolgens gebruikt in 6 uur blootstellingen voor microarray of high-throughput PCR reacties. Voor primaire muizencellen (thymus- en miltcellen) werd een iets andere doseringsbepaling gevolgd. Omdat de viabiliteit van deze primaire cellen afneemt vanaf het moment van isolatie, werden de doseringen van deze cellen gebaseerd op de

viabiliteitsexperimenten van muizen EL-4 en CTLL-2 cellijnen. De viabiliteit van primaire cellen werd bepaald na 6 uur in plaats van 24 uur blootstelling. Deze methodes voor het bepalen van een optimale testconcentratie werden bij elke stof gebruikt, waardoor de vergelijking tussen verschillende experimenten valide is.

Geschiktheid van muizen cellijnen in het detecteren van de werkingsmechanismes van immunotoxische stoffen

Om de geschiktheid van de CTLL-2 en EL-4 cellijnen voor immunotoxiciteitstesten te bestuderen werden beide muizencellijnen blootgesteld aan drie model immunotoxische of immunosuppressieve stoffen en werden de effecten van deze stoffen op genexpressie geanalyseerd met behulp van microarrays (transcriptomics). Daarnaast werd gebruik gemaakt van primaire muizen cellen (milt/thymus) en muizenorganen van *in vivo* experimenten. Transcriptomics werd gebruikt om de verschillen tussen muizen CTLL-2 cellen, muizen EL-4 cellen, primaire cellen (*in vitro*) en muizen milt (*in vivo*) te vergelijken. De uitdaging was om te bepalen welke van de cellijnen een transcriptomics respons geeft die het beste overeenkomt met het verwachte werkmechanisme. Voor de blootstelling werden stoffen geselecteerd waarvan het werkingsmechanisme al bekend was. De eerste stof betrof Ciclosporine A (CsA), een immunosuppressief medicament welke bij orgaantransplantaties gebruikt wordt om afstoting te voorkomen en beschermt tegen graft-versus-host ziekte. CsA verlaagt de T cel activatie respons en induceert Endoplasmatisch Reticulum (ER) stress en oxidatieve stress, wat uiteindelijk leidt tot apoptose in T cellen. De experimenten uitgevoerd met CsA staan beschreven in **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift. Ook werden soort-overstijgende (muis – mens) vergelijkingen gemaakt met transcriptomics responsen op CsA blootstellingen in de humane T cellijn (Jurkat), humane lever cellijn (HepG2) en humane nier (RPTEC/TERT1) cellijn, gepubliceerd door anderen. De effecten op procesniveau en op individuele genexpressie waren bijna gelijk voor CTLL-2 en EL-4 cellen. CsA induceerde in beide cellijnen een verhoogde mRNA expressie van genen betrokken bij oxidatieve stress, ER stress en apoptose. Genen waarvan CsA de expressie in de humane cellijnen Jurkat, HepG2 en RPTEC/TERT1 cellen verhoogt, werden ook door CsA in de muizen cellen (EL-4, CTLL-2 en primaire miltcellen) verhoogd tot expressie gebracht. Genen waarvan de expressie in humane cellen verlaagd werd door CsA, werden daarentegen niet in muizencellen verlaagd.

Milten van muizen die *in vivo* blootgesteld werden aan CsA lieten slechts weinig verandering in genexpressie zien, met uitzondering van een groepje celcyclus-gerelateerde genen waarvan de expressie verlaagd werd. De oorzaak van deze geringe respons ligt waarschijnlijk in het feit dat apoptotische T cellen uit de milt verwijderd worden door monocyt en Natural Killer cellen. Dit was in overeenstemming met de verhoogde expressie van monocyt en Natural Killer cel specifieke genen in met CsA blootgestelde milten. Na analyse van verschillende mechanismen en vergelijkingen tussen bestaande datasets bleken CTLL-2 cellen het beste de effecten op de voor CsA relevante processen weer te geven. T cel activatie was verminderd in CTLL-2 cellen, echter, deze vermindering

was niet overtuigend. EL-4 cellen waren nog minder geschikt om de remming van T cel activatie te detecteren. Eén van de karakteristieken van de CTLL-2 cellijn is dat deze gekweekt moet worden in de aanwezigheid van een T cel stimulans, zoals IL-2, waarmee T cel activatie wordt gestimuleerd. Hierdoor zijn CTLL-2 cellen beter in het detecteren van door CsA veroorzaakte T cel inhibitie (**Hoofdstuk 2**) dan EL-4 cellen. In de andere gebruikte cellijnen werd geen T cel activatie tijdens kweek gebruikt.

Twee immunotoxische stoffen deoxynivalenol (DON) en tributyltin oxide (TBTO) werden gebruikt in **Hoofdstuk 3 en 4**. DON is een schimmeltoxine (mycotoxine) dat op landbouwproducten zoals mais en tarwe gevonden kan worden. Omdat DON stabiel blijft tijdens verhitting en koken, worden mensen continu blootgesteld aan lage hoeveelheden van dit mycotoxine. Het is bekend dat DON ribotoxische stress induceert, wat leidt tot ER stress en T cel activatie en specifiek aangrijpt op cellen in de thymus en beenmerg. TBTO is een organotin verbinding die gebruikt werd in verschillende industriële processen. TBTO werd verwerkt in scheepsverf om de groei van weekdieren aan de buitenkant van schepen tegen te gaan, maar TBTO werd ook gebruikt in plastic vloertegels en als houtbeschermer, waardoor TBTO wereldwijd in het milieu verspreid werd. Het werkingsmechanisme van TBTO heeft overeenkomsten met dat van DON. TBTO induceert een ER stress respons leidend tot T cel activatie en grijpt daarnaast *in vivo* ook specifiek aan op de thymus. Een verschil tussen DON en TBTO is dat DON ER stress induceert via ribotoxische stress inductie, waar TBTO een direct effect heeft op het ER. Omdat zowel DON als TBTO reeds uitgebreid bestudeerd zijn in *in vitro* en *in vivo* immunotoxiciteitsstudies, werden beide als modelstoffen gebruikt om de geschiktheid van muizen EL-4 cellen (**Hoofdstuk 3**) en CTLL-2 cellen (**Hoofdstuk 4**) te testen. Resultaten van de blootstellingen van EL-4 cellen aan DON werden vergeleken met muizen CTLL-2 cellen (*in vitro*), muizen thymocyten (*in vitro*), muizen thymocyten (*in vivo*) en humane Jurkat T cellen (*in vitro*). DON blootstelling in EL-4 cellen zorgde voor een verhoging van genexpressie in genen uit ribosoom biogenese en RNA processing. Deze verhoging van expressie was echter lager dan in humane Jurkat T cellen. DON induceerde ook een verhoogde expressie van genen betrokken bij ribosoom biogenese in CTLL-2 cellen, maar deze inductie werd overtuigender waargenomen in EL-4 cellen. Zowel CTLL-2 cellen als EL-4 cellen veroorzaakten geen verhoging van de overige processen behorende tot het werkingsmechanisme van DON (ER stress, T cel activatie en apoptose). Zoals verwacht werd de expressie van genen in deze processen wel verhoogd in Jurkat T cellen. De EL-4 en CTLL-2 cellijn zijn mogelijk niet in staat om ER stress, T cel activatie en apoptose te induceren door het ontbreken van genen (of functionaliteit van genen) die betrokken zijn in de link tussen ribotoxische stress en ER stress.

Het werkingsmechanisme van TBTO (inductie van ER stress, T cel activatie en apoptose) werd slechts gedeeltelijk gerepresenteerd in EL-4 cellen. ER stress werd geïnduceerd in EL-4 cellen, maar dit leidde niet tot een daarop volgende T cel activatie en apoptose. Door een mutatie in het calcineurine-gen is de T cel activatie respons al continu in EL-4 cellen geactiveerd, en kan mogelijk niet nog verder geactiveerd worden. De expressie van genen

betrokken bij de processen ER stress, T cel activatie en apoptose werden wel duidelijk door TBTO verhoogd in CTLL-2. De vergelijkingen op basis van genen en processen, welke belangrijk zijn in de immunotoxische actie van TBTO, maakten duidelijk dat deze beter gedetecteerd werden in CTLL-2 cellen, Jurkat T cellen en muis primaire thymocyten dan in EL-4 cellen. De processen behorende bij het werkingsmechanisme van DON werden beter gerepresenteerd in Jurkat T cellen en muis thymus *in vivo* dan in CTLL-2 cellen of EL-4 cellen. Omdat zowel EL-4 cellen als CTLL-2 cellen niet in staat waren om de werkingsmechanismen van elk van de drie de geteste stoffen (CsA, TBTO en DON) op te pikken, werd besloten deze cellijnen niet meer te gebruiken in toekomstige immunotoxische experimenten.

Directe vergelijking van de werkingsmechanismen van DON en TBTO in humane Jurkat T cellen

Omdat eerdere transcriptomics experimenten naar de effecten van DON en TBTO in de humane T cellijn Jurkat het werkingsmechanisme van beide stoffen verhelderden, werden deze stoffen in een microarray vergelijkingsexperiment gebruikt. Om de resultaten die verkregen zijn met DON en TBTO te verifiëren werden modelstoffen met een verwacht (deels) gelijk werkingsmechanisme gebruikt, zoals anisomycin, ionomycin en thapsigargin (**Hoofdstuk 5**). De rationale achter deze studie is dat stoffen welke werken volgens eenzelfde mechanisme ook eenzelfde genexpressie profiel zullen veroorzaken.

Thapsigargin werd gebruikt als positieve controle voor ER stress inductie geïnduceerd door vrijgifte van calcium ionen vanuit het ER naar het cytoplasma leidend tot apoptose. Ionomycin staat bekend om zijn calcium verhogend effect door het vrijmaken van calcium uit intracellulaire opslag en werkt vervolgens als T cel activator. Van anisomycin is bekend dat het de eiwit synthese remt. Anisomycin hecht aan 28s rRNA en veroorzaakt een ribotoxische stress respons. Op basis van de microarray data beschreven in **Hoofdstuk 5** werd duidelijk dat anisomycin en DON genexpressie profielen veroorzaakten, welke bijna identiek aan elkaar waren. Daardoor kunnen we stellen dat deze stoffen een gelijk werkingsmechanisme hebben. TBTO verhoogde de genen in T cel activatie, ER stress inductie en apoptose, welke ook verhoogd werden door thapsigargin en ionomycin. Daarnaast werd een set genen geïdentificeerd waar alleen TBTO op aangreep. Deze genen waren betrokken bij efficiënte vouwing van DNA rondom histonen. Deze studie liet nogmaals zien dat toxicogenomics een toegevoegde waarde heeft bij het detecteren van overeenkomsten en verschillen in de werkingsmechanismen van verschillende stoffen.

Voortgang richting proefdiervrije immunotoxiciteitstesten

Parallel aan de experimenten beschreven in **Hoofdstuk 2-5** werden grootschalige microarray blootstellingsstudies uitgevoerd door Shao *et. al.*, gebruikmakend van Jurkat T cellen en sets van immunotoxische en niet-immunotoxische stoffen. Het doel van deze experimenten was het identificeren van mogelijke immunotoxische werkingsmechanismen en identificatie van classificatiegenen die als *in vitro* biomerkers voor humane

immunotoxiciteit kunnen dienen. De uitkomst van de studies van Shao *et al.* was een set van 25 genen die met hoge sensitiviteit (88%), specificiteit (67%) en nauwkeurigheid (85%) de immunotoxiciteit van stoffen kunnen voorspellen. Ondanks deze veelbelovende resultaten bleven een aantal vragen en kwesties onbeantwoord. Eén van deze vragen is: “Hoe zijn de prestaties van dit screeningsmodel wanneer stoffen worden getest van klassen die nog niet eerder getest zijn?”. Een andere kwestie is het geringe aantal niet-immunotoxische stoffen in de studies van Shao *et al.* Daarom werden Jurkat T cellen in **Hoofdstuk 6** blootgesteld aan een nieuwe set van 14 stoffen waarvan enkele tot klassen behoren welke nog niet eerder zijn getest. Vijf van de 14 stoffen waren bekende niet-immunotoxische stoffen. De onbalans tussen geteste immunotoxische en niet-immunotoxische stoffen zal altijd aanwezig zijn omdat er van weinig stoffen beschreven is dat ze bewezen niet-immunotoxische stoffen zijn. Dit komt doordat immunotoxiciteitsstudies in het algemeen niet worden uitgevoerd op stoffen waarvan geen immunotoxiciteit wordt verwacht. Een tweede reden is dat richtlijnen doorgaans weinig of geen informatie verlangen over mogelijke immunotoxiciteit van stoffen. Omdat een gelimiteerde set genen reeds was geïdentificeerd als classificatie genen voor humane immunotoxiciteit door Shao *et al.*, werd gekozen voor een Fluidigm analyse in plaats van microarray analyse. Dit zorgde voor snelle resultaten die gemakkelijker te analyseren zijn in vergelijking met microarray data analyse. Van de 14 stoffen die gebruikt zijn in de Fluidigm studie werden er 13 correct geclassificeerd. Sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid waren respectievelijk 100%, 80% en 93%. Wanneer deze resultaten gecombineerd worden met de resultaten van de studies van Shao *et al.* komt men tot 91% sensitiviteit, 71% specificiteit en 83% nauwkeurigheid voor de 25 biomerkers.

Toekomstige verandering in richtlijnen

Het onderzoek dat uitgevoerd werd in dit proefschrift leverde uiteindelijk een set biomerkers op met hoge specificiteit, sensitiviteit en nauwkeurigheid voor immunotoxische voorspellingen. Hoe overtuigend de resultaten ook mogen zijn, dit betekent niet dat dierproeven voor immunotoxiciteitstesten snel vervangen zullen worden door *in vitro* screenings met chemicaliën in Jurkat T cellen. Dierproeven zouden echter niet als gouden standaard gezien moeten worden voor de effecten die optreden in mensen. Om die reden is de validatie van de extrapolatie van effecten op mens *in vitro* naar mens *in vivo* door middel van dierproeven niet ideaal. Gebruik maken van humane cellijnen en weefsels blootgesteld aan dezelfde stof en identificatie van de werkingsmechanismen in humane systemen zou een betere opzet zijn. Echter, de complexiteit van het immuunsysteem (meerdere organen, weefsels en cellen) is beperkend om deze strategie toe te passen voor immunotoxiciteit. Sommige initiatieven, zoals ASAT (Assuring Safety without Animal Testing), doelen op het gebruik van humane data van blootstellingsexperimenten, gerelateerd aan specifieke menselijke ziektes, om vergelijkingen mogelijk te maken. In die zin is de ASAT benadering anders dan de meeste klassieke validatie benaderingen omdat het niet berust op de resultaten van dierproeven voor de validatie. Het veranderproces in de richtlijnen en wetten

om nieuwe *in vitro* alternatieven voor immunotoxiciteitstesten te implementeren is een lange weg. Dit komt door de behoefte aan betrouwbare en gevalideerde (immuno)toxiciteitstesten door de overkoepelende organisaties. Het kan meerdere jaren duren voordat een bewezen alternatief algemeen geaccepteerd wordt. Tot dat moment zullen producenten van nieuwe stoffen en medicijnen zich moeten conformeren aan de huidige wetten die voorschrijven dat de stoffen in dierproeven getest moeten zijn op immunotoxiciteit.

Om sneller tot algemene acceptatie voor *in vitro* testen te komen, verzamelden verscheidene instituten in de VS hun plannen in een visiedocument getiteld “Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy”, welke gepubliceerd werd door de National Academic Press in 2007. Deze visie behelst het verplaatsen van onderzoek richting het gebruik van meer high-throughput methoden gebaseerd op cellen of cellijnen, bij voorkeur van humane oorsprong. Daarnaast meldt het document dat nieuwe toxiciteit testsystemen gebruikt moeten worden om de biologisch relevante veranderingen in de belangrijkste toxiciteit pathways te evalueren gefocust op humane biologie. Deze twee punten (gebruik maken van humane *in vitro* celsystemen en kennis m.b.t. toxiciteit pathways) zijn duidelijk behandeld in dit proefschrift daar experimenten zijn uitgevoerd in humane Jurkat T cellen en gebruik werd gemaakt van microarrays in combinatie met tools zoals GSEA of MetaCore om de biologische respons te bestuderen.

Conclusie

Dit proefschrift richtte zich op het testen van de bruikbaarheid van twee muizen cellijnen en één humane cellijn voor toepassing in immunotoxiciteitstesten. De experimenten toonden enkele duidelijke nadelen van de muizen EL-4 en CTLL-2 cellijnen aan. Beide cellijnen waren, in tegenstelling tot de Jurkat cellijn, niet in staat om de belangrijke immunotoxische processen van CsA, DON en TBTO te detecteren. Enerzijds is de T cel activatie respons maximaal geactiveerd in zowel de CTLL-2 cellijn (door standaard kweek procedures) als de EL-4 cellijn (door genetische activatie van calcineurine gen). Anderzijds is de verwachte afwezigheid van (functionele) genen die belangrijk zijn in de link tussen ribotoxische stress, ER stress en T cel activatie. Beide redenen maken de CTLL-2 en EL-4 cellen minder geschikt voor immunotoxiciteitsstudies in vergelijking met humane Jurkat cellen. De progressie die geboekt werd met Jurkat cellen resulteerde in een set op mechanisme gebaseerde immunotoxische biomerkers welke verder gevalideerd werden in dit proefschrift. Dit resulteerde in een hoge sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid. Alles bij elkaar leverde de resultaten van dit proefschrift een bruikbare set genetische merkers op, welke gebruikt kunnen worden in *in vitro* onderzoek met bestaande en nieuwe stoffen om voorspellingen te doen over de immunotoxiciteit en werkingsmechanismen in mensen.