

Application of omics to immunotoxicology : from mechanisms of action to alternative testing strategies

Citation for published version (APA):

Shao, J. (2015). *Application of omics to immunotoxicology : from mechanisms of action to alternative testing strategies*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Uitgeverij BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20150211js>

Document status and date:

Published: 01/01/2015

DOI:

[10.26481/dis.20150211js](https://doi.org/10.26481/dis.20150211js)

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.

Download date: 09 Dec. 2024

Samenvatting (Summary in Dutch)

Het doel van het werk beschreven in dit proefschrift was tweeledig. Ten eerste, het identificeren van werkingsmechanismen die betrokken zijn bij directe immunotoxiciteit; ten tweede, het identificeren van functionele biomerkers welke vervolgens gebruikt kunnen worden voor het ontwikkelen van een *in vitro* assay voor het voorspellen van directe immunotoxiciteit. **Hoofdstuk 1** geeft een overzicht van het immuunsysteem, definities die gebruikt worden in het onderzoeksveld van de immunotoxicologie, huidige *in vitro* en *in vivo* testen voor het vaststellen van immunotoxiciteit en de huidige stand van zaken met betrekking tot het toepassen van –omics technieken binnen de immunotoxicologie (immunotoxicogenomics). In het licht van de bovenvermelde doelstellingen, zijn de overige hoofdstukken van het proefschrift (**Hoofdstuk 2-7**) verdeeld over twee secties.

Sectie 1 is gericht op het in kaart brengen van cellulaire processen die bij verstoring door chemicaliën kunnen resulteren in direct immunotoxiciteit. In **Hoofdstuk 2** is de humane T lymfocyt cellijn Jurkat blootgesteld aan een groot aantal stoffen waaronder immunotoxische contaminanten, immunosuppressieve medicijnen en niet-immunotoxische controle chemicaliën en zijn de effecten op genoom-wijde mRNA expressie (oftewel transcriptoom) bestudeerd met behulp van DNA microarrays. Deze studie heeft geleid tot de identificatie van verscheidene werkingsmechanismen waarvan een aantal gedeeld werden door meerdere chemicaliën. In **Hoofdstuk 3** is vervolgens van een subset van deze stoffen nagegaan of deze effecten hebben op de fosforylering van eiwitten waarvan bekend is dat ze een belangrijke rol spelen in cellulaire signaleringsroutes. Daartoe zijn eiwitextracten van blootgestelde Jurkat cellen geanalyseerd met behulp van antilichaam arrays. Daar een van de gemeenschappelijk gemoduleerde signaleringsroutes in de richting wees van celmigratie, werd het effect van een aantal immunotoxische stoffen op dit proces nader bestudeerd met een functionele chemotaxis assay (**Hoofdstuk 4**). In **Hoofdstuk 5** is, aan de hand van TBTO als model immunotoxische stof, een microarray studie uitgevoerd met Perifere Bloed Mononucleaire Cellen (PBMCs) met als doel om na te gaan of de in de Jurkat cellijn veranderde processen ook in humane primaire immuuncellen zouden optreden.

In Sectie 2 worden de identificatie en validatie van biomarker genen voor directe immunotoxiciteit beschreven. In **Hoofdstuk 6** zijn de microarray data die beschreven zijn in Hoofdstuk 2 verder geanalyseerd om genen te identificeren die gebruikt kunnen worden voor het classificeren van stoffen als immunotoxisch of niet-immunotoxisch. De geïdentificeerde genen zijn verder op waarde beoordeeld in validatie experimenten met nieuwe sets van immunotoxische en niet-immunotoxische chemicaliën (**Hoofdstukken 6 en 7**).

Potentiele mechanismen die ten grondslag liggen aan directe immunotoxiciteit

Identificatie van werkingsmechanismen door middel van transcriptoom analyse

Onlangs zijn een aantal *in vitro* en *in vivo* studies gepubliceerd waarin via een toxicogenomics benadering meer inzicht verkregen is in de werkingsmechanismen van immunotoxische stoffen. Het ging in deze studies echter om een beperkt aantal stoffen waaronder het biocide TBTO en het

mycotoxine DON. In **Hoofdstuk 2** zijn de effecten van een groot aantal verschillende chemicaliën op het transcriptoom van de humane Jurkat T cellijn bestudeerd. Deze chemicaliën (in totaal 31) betroffen milieu contaminanten, zware metalen, pesticiden, biociden, mycotoxinen, immunospressieve geneesmiddelen en niet-immunotoxische controle chemicaliën. Na bioinformatische analyse van de transcriptoom data kon vastgesteld worden dat meerdere chemicaliën (>3) invloed hadden op dezelfde biologische processen, zoals ER stress, oxydatieve stress, anti-apoptose, controle van de cell cyclus, metabolisme van cholesterol en lipiden en regulatie van transcriptie en translatie. Verder werden processen, zoals Notch signalering, NF-κB signalering en RXR/RAR signalering specifiek beïnvloed door één of twee immunotoxische stoffen. Een aantal van deze processen werd ook reeds geïdentificeerd in de eerdere toxicogenomics studies. Dat laatste geldt niet voor de modulatie van lipiden/cholesterol metabolisme, RXR/RAR signalering en Notch signalering. Deze zijn nieuwe voor directe immunotoxiciteit potentieel relevante processen.

Identificatie van werkingsmechanismen door middel van profilering van eiwit fosforylering

Hoofdstuk 3 beschrijft onderzoek naar de effecten van een subset van de in **Hoofdstuk 2** onderzochte chemicaliën op de fosforylering van eiwitten, in het bijzonder kinases, in Jurkat cellen met behulp van receptor tyrosine kinase (RTK) antilichaam arrays. De subset van chemicaliën bestond uit vijf immunotoxische stoffen (lindaan, ochratoxine A, TBTC, TBTO en DON), twee immunosuppressieve medicijnen (rapamycine en mycofenolzuur) en twee niet-immunotoxische controle chemicaliën (urethaan en mannitol). Een aantal van de immuotoxische/immunosuppressieve stoffen bleken de fosforylering van dezelfde kinases te beïnvloeden. Met name het ribosomale eiwit S6 werd door meerdere chemicaliën, inclusief TBTO, gefosforyleerd. De resultaten verkregen met TBTO konden vervolgens bevestigd worden met flow cytometrie en Western blotting. Van RPS6 is bekend dat het een belangrijk downstream effector is van de mTOR-p70S6K-RPS6 route. Vervolgonderzoek richtte zich dan ook het verkrijgen van meer inzicht in het effect van TBTO op deze route. Daarbij werd ook rapamycine meegenomen omdat deze stof bekend staat als een selectieve remmer van de kinase mTOR. Behandeling van Jurkat cellen met TBTO resulteerde in defosforylering van p70S6K maar had geen effect op de fosforylering van mTOR; rapamycin behandeling leidde echter tot defosforylering van mTOR en p70S6K. Deze bevinding duidde er op dat zowel TBTO als rapamycine de p70S6K route remmen, maar via verschillende moleculaire mechanismen. Dit resultaat suggereert dat, hoewel verschillende van de onderzochte stoffen een effect hebben op de p70S6K route, de primaire aangrijpingspunten van deze stoffen op verschillende niveaus van de route kunnen liggen.

Vergelijking van de transcriptoom en eiwit fosforylering data

In **Hoofdstuk 3** is een vergelijking gemaakt van de microarray data en de eiwit fosforylering data die verkregen zijn na behandeling van Jurkat cellen met TBTO. Beide typen data doen vermoeden dat TBTO ribosoom biogenese en celmigratie processen kan beïnvloeden.

Functionele assay: in vitro trans-well chemotaxis assay

In **Hoofdstuk 3** zijn experimenten gedaan om het mogelijk effect van TBTO op celmigratie verder te onderzoeken. Daartoe is een *in vitro* trans-well chemotaxis assay opgezet waarbij gebruik gemaakt werd van Jurkat cellen en het chemokine CXCL12. De resultaten lieten zien dat TBTO de CXCL12 gemedieerde migratie van Jurkat cellen inhibiteerde, wat een bevestiging is van de hypothese geformuleerd op basis van de transcriptoom en eiwit fosforylering data.

In **Hoofdstuk 4** is de *in vitro* trans-well chemotaxis assay breder ingezet om andere immunotoxische stoffen te testen op chemotaxis-modulerende eigenschappen. Daartoe is eerst een uitvoerige analyse gedaan van de in Hoofdstuk 2 gegenereerde transcriptoom data met het accent op mRNA expressie van genen waarvan bekend is dat ze betrokken zijn bij celmigratie. Deze analyse resulteerde in de identificatie van zeven chemicaliën waarvan vijf, door te testen in de the trans-well chemotaxis assay, geormerkt konden worden als chemotaxis remmer. Een andere set van zes chemicaliën, waarvoor op basis van de transcriptoom data geen aanwijzing gevonden kon worden voor een effect op celmigratie, werden eveneens getest met de assay. Een van deze zes stoffen, mycofenolzuur, bleek echter de chemotaxis van Jurkat cellen te remmen. Deze bevinding gaf aan dat CXCL12 gemedieerde chemotaxis niet alleen op transcriptoom niveau gereguleerd wordt. Niettemin lieten de resultaten zien dat sommige immunotoxische stoffen hun effecten op het immuun systeem kunnen uitoefenen door remming van CXCL12 gemedieerde chemotaxis.

Effecten van TBTO op perifere bloed mononucleaire cellen

Daar de bovengenoemde resultaten verkregen werden met een T-cel lijn (Jurkat) was het van belang om na te gaan of vergelijkbare effecten zouden optreden in humane primaire cellen. **Hoofdstuk 5** beschrijft experimenten waarin vers geïsoleerde perifere bloed mononucleaire cellen (PBMCs) werden blootgesteld aan de model immunotoxische stof TBTO gevolgd door transcriptoom analyse. De microarray data lieten zien dat verschillende biologische processen, zoals ER stress, oxydatieve stress en functioneren van mitochondria beïnvloed worden door TBTO in humane PBMCs. Deze processen werden ook aangedaan door TBTO in de Jurkat cellijn (zie **Hoofdstuk 2**) wat wijst op een goede correlatie tussen de twee *in vitro* systemen. Bovendien werd gevonden dat in PBMCs, maar niet in Jurkat cellen, de expressie van genen specifiek voor bepaalde lymfocyten subsets (T, B en NK cellen), monocyt, dendritische cellen en granulocyten beïnvloed werd door TBTO. Dit is waarschijnlijk terug te voeren op de heterogene samenstelling van de PBMCs.

Functionele biomerkers ten behoeve van de ontwikkeling van een predictieve assay

Identificatie en eerste ronde validatie van biomerkers

In **Hoofdstuk 6** werden de microarray data (gegenereerd in **Hoofdstuk 2**) geanalyseerd met het doel genen te identificeren die onderscheid zouden kunnen maken tussen immunotoxische en niet-immunotoxische stoffen. In eerste instantie werden 27 genen geselecteerd als kandidaat biomerkers. Deze genen waren representatief voor de verschillende werkingsmechanismen die mogelijk ten grondslag liggen aan directe immunotoxiciteit. Het effect van de 31 in **Hoofdstuk 2** onderzochte stoffen op de expressie van deze 27 genen kon bevestigd worden met qRT-PCR. Vervolgens werd een training set van in totaal 44 chemicaliën samengesteld bestaande uit de 31 eerder gebruikte chemicaliën en 13 additionele immunotoxische stoffen. Na behandeling van Jurkat cellen met deze stoffen werden de expressieniveaus van de 27 genen bepaald met qRT-PCR. Vervolgens werd op basis van de qRT-PCR data een redundantie analyse gedaan. De uitkomst van deze analyse was dat minimaal 25 genen nodig zijn om tot de meest accurate classificatie immunotoxisch versus niet-immunotoxisch te komen, zonder daarbij enige functionele informatie van de set van 27 genen te verliezen. De prestatie van de set van 25 genen werd verder onderzocht aan de hand van 20 nieuwe chemicaliën (17 immunotoxische en 3 nonimmunotoxische) wat resulteerde in een sensitiviteit van 88%, een specificiteit van 67% en een accuraatheid van 85%.

Tweede ronde validatie van de biomerkers

De prestatie karakteristieken van de 25 genen zoals vastgesteld in **Hoofdstuk 6** riepen twee belangrijke vragen op. De eerste had betrekking op de prestatie van de genen set wanneer Jurkat cellen behandeld zouden worden met nieuwe klassen van immunotoxische stoffen. De tweede vraag was hoe de prestatie van de genen set zou zijn wanneer meer niet-immunotoxische chemicaliën meegenomen zouden worden. Immers, in de studie beschreven in Hoofdstuk 6 werd slechts een relatief klein aantal niet-immunotoxische controle chemicaliën getest wat mogelijk de reden was voor de matige specificiteit van 67%. Om deze vragen te beantwoorden werd voor de studie beschreven in **Hoofdstuk 7** een set van 18 van chemicaliën geselecteerd bestaande uit 9 immunotoxische stoffen, 5 niet-immunotoxische controle chemicaliën en 4 stoffen waarvan de immunotoxiciteit voor de mens nog niet helemaal vastgesteld was. Onder de 9 immunotoxische stoffen bevonden zich nieuwe chemische klassen die in de voorgaande hoofdstukken nog niet getest waren, zoals de gebromeerde vlamvertrager TBBPA en het immunosuppressieve medicijn anti-CD3. Op basis van de resultaten verkregen met de 9 immunotoxische en 5 niet-immunotoxische chemicaliën kon geconcludeerd worden dat de set van 25 genen beter presteerde vergeleken met de eerste ronde validatie. De prestatie van de genen set was als volgt: 100% sensitiviteit, 80% specificiteit en 93% accuraatheid.

Algehele conclusie

De in dit proefschrift beschreven resultaten laten zien dat de toepassing van toxicogenomics in combinatie met *in vitro* celsystemen waardevolle informatie kan verschaffen over de werkingsmechanismen van immunotoxische stoffen en, middels de identificatie van biomarker genen, een aanzet heeft gegeven voor de ontwikkeling van een voorspellende assay voor directe immunotoxiciteit. Deze assay ziet er beloftevol uit maar heeft mogelijk een aantal beperkingen, zoals het foutief classificeren van chemicaliën die specifiek aangrijpen op andere immuuncellen dan T-lymfocyten. Daarom zou de assay ingezet kunnen worden voor het screenen van bestaande en nieuwe chemicaliën op mogelijke immunotoxische gevaren en het prioriteren van deze stoffen voor verder (regulatoir) onderzoek, niet zozeer als een op zichzelf staande test, maar eerder als onderdeel van een batterij van *in vitro* assays.

