

University of Groningen

Macrophage-matrix interactions: orchestrating the fibrotic response?

Vasse, Gwenda

DOI:
[10.33612/diss.170746933](https://doi.org/10.33612/diss.170746933)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Vasse, G. (2021). *Macrophage-matrix interactions: orchestrating the fibrotic response?* [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.170746933>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Appendices

SAMENVATTING

ACKNOWLEDGEMENTS

ABOUT THE AUTHOR

LIST OF PUBLICATIONS

SAMENVATTING

Longfibrose is een ernstige en progressieve longziekte die wordt gekenmerkt door littekenvorming in de longen en daaropvolgend verlies van longfunctie. De littekenvorming kan bijvoorbeeld veroorzaakt worden door medicatie, bestraling of irriterende stoffen in de omgeving zoals asbest, maar ook door onderliggende systemische ziekten. Meestal is de oorzaak echter onbekend en deze gevallen worden geclassificeerd als idiopathische longfibrose (IPF). Patiënten met IPF lijden aan toenemende kortademigheid, vermoeidheid en een droge hoest. De progressie van de ziekte kan variëren van zeer langzaam tot snel, met of zonder acute exacerbaties (longaanvallen) die resulteren in episodes van snel verlies van longfunctie. De gemiddelde levensverwachting na diagnose is slechts 2-3 jaar. Hoewel jaren onderzoek ons begrip van IPF hebben vergroot, heeft de verbeterde kennis van risicofactoren en mechanismen nog niet geresulteerd in effectieve behandelingen om deze onomkeerbare en progressieve ziekte onder controle te houden of te genezen.

In de longen van patiënten met IPF resulteert een verstoorde wondgenezing in een extracellulaire matrix (ECM) met afwijkende biochemische en biofysische eigenschappen. Macrofagen zouden, als belangrijke regulatoren van de wondgenezing, fibrose moeten kunnen voorkomen of oplossen door de productie en afbraak van ECM-eiwitten te reguleren. In feite kunnen macrofagen worden vergeleken met de dirigent van een orkest, die de verschillende celtypen (de musici) begeleidt door de verschillende stadia van de wondgenezingsreactie (de partituur). Polariseren van macrofagen naar verschillende fenotypes in reactie op signalen uit hun micro-omgeving (de muziek) zorgt voor de tijdige start en finish van de verschillende spelers, evenals de balans. Na verwonding van weefsel polariseren macrofagen in eerste instantie naar een pro-inflammatoir fenotype dat het beschadigde weefsel beschermt tegen infiltrerende micro-organismen. Vervolgens nemen macrofagen een pro-genezend fenotype aan om het herstel van de wond te stimuleren. Dit fenotype wordt geassocieerd met de productie van ECM-eiwitten door myofibroblasten. Uiteindelijk polariseren macrofagen naar een fenotype dat inflammatoire immunoreacties dempt en de normale weefselarchitectuur herstelt door overtollige ECM te verwijderen. Aangezien atypische macrofaagpolarisatie wordt waargenomen in fibrose en ook wordt verondersteld bij te dragen aan fibrose, is verder onderzoek naar de rol van macrofagen in de ontwikkeling en persistentie van fibrose gerechtvaardigd. Hoewel het effect van een breed scala aan factoren op de polarisatie van macrofagen al is onderzocht, is de impact van directe interacties tussen (fibrotische) matrix en macrofagen op het vermogen van de macrofagen om de wondgenezing te orkestreren nog onduidelijk en daarom de focus van dit proefschrift.

Talrijke studies hebben het effect van (fibrose-gerelateerde) veranderingen in het micromilieu op de polarisatie en het gedrag van macrofagen onderzocht (besproken in **Hoofdstuk 2**). Biochemisch gezien beïnvloedt de overmatige afzetting van ECM-eiwitten zoals collagenen, fibronectine, periostin en glycosaminoglycanen de polarisatie van macrofagen,

meestal door integrine-gerelateerde signalering. De biochemische veranderingen van de ECM hebben bijgevolg invloed op de biofysische eigenschappen van het weefsel, zoals de stijfheid en microstructuur. Macrofagen kunnen deze biofysische veranderingen detecteren en transduceren via receptoren zoals Toll-like receptor 4 (TLR4), ionenkanalen zoals Transient receptor vanilloid-type 4 (TRPV4) en integrine-gerelateerde signalering. De daaropvolgende macrofaagrespons wordt echter vaak beoordeeld op basis van de expressie van enkele merkers, wat slechts beperkte informatie geeft over het functionele pro- of anti-fibrotische gedrag van de macrofagen. Daarnaast worden er in de literatuur veel tegenstrijdige resultaten beschreven, waardoor het moeilijk is om de huidige kennis te vertalen naar een beter begrip van macrofaag-matrixinteracties in de fibrotische respons.

Een deel van het probleem is de uitdaging om fibrose-gerelateerde microstructurele en biofysische ECM-veranderingen *in vitro* na te bootsen om de reacties van cellen te kunnen bestuderen. In **Hoofdstuk 3** werd een op collageen type I-gebaseerd *in vitro* model ontwikkeld om de respons van alveolaire macrofagen op collageenlagen met variërende morfologie en stijfheid te onderzoeken. Hoewel effecten van substraatstijfheid op het gedrag van macrofagen eerder zijn beschreven (besproken in **Hoofdstuk 2**), hebben we in het geteste bereik geen enkele invloed van substraatstijfheid op de polarisatie van macrofagen gevonden. De collageenmorfologie had echter wel invloed op de vorm, het gedrag en de merkerexpressie van macrofagen. Macrofagen gekweekt op fibreus collageen transmigreerden meer en vertoonden een hogere expressie en secretie van Ym1, een muriene merker van weefselherstellende macrofagen. Daarentegen hadden macrofagen die gekweekt werden op globulair (niet-fibreus) collageen een hogere expressie van CD206, de mannose receptor die betrokken is bij de afbraak van collageen en waarvan bekend is dat deze hoger tot expressie komt op alveolaire macrofagen van patiënten met IPF. De geobserveerde veranderingen in merkerexpressie, vorm en gedrag waren vrij subtiel en duiden niet op een volledige verandering in het macrofaagfenotype. Deze waarneming kan echter vertekend zijn, omdat het aantal onderzochte merkers beperkt was. Om een onbevooroordeeld beeld te krijgen van de signaleringsroutes die betrokken zijn bij de waargenomen macrofaagresponsen, pasten we een proteomica-benadering toe in **Hoofdstuk 4**. Interessant genoeg ontdekten we dat de aanwezigheid van collageen type I de proteomische signatuur van macrofagen al beïnvloedde in vergelijking met macrofagen gekweekt op ongecoate substraten, en dan met name de expressie van metabolisme-gerelateerde eiwitten. Daarnaast werden meerdere morfologie-gerelateerde effecten gevonden die de eerder waargenomen veranderingen in de vorm, merkerexpressie en het gedrag van de macrofagen zouden kunnen verklaren. Hoewel de twee verschillende morfologieën van collageen in dit *in vitro* model niet direct representatief zijn voor de *in vivo* situatie, toonde dit onderzoek wel aan dat alveolaire macrofagen gevoelig zijn voor morfologische veranderingen van collageen type I en leverde het interessante nieuwe kandidaten op die mogelijk een onverwachte rol spelen in macrofaag-matrix interacties en macrofaagpolarisatie. Vervolgonderzoek zal de functie van deze kandidaten en hun mogelijke bijdrage in fibrotische responsen verifiëren.

Hoewel er de afgelopen jaren veel vooruitgang is geboekt, is de kennis over de exacte microstructurele ECM-veranderingen in fibrose nog steeds beperkt. In **Hoofdstuk 5** hebben we een collageen hybridiserend peptide gebruikt om de hoeveelheid collageen met een afwijkende structuur in longweefsel van patiënten met IPF en een controlegroep zichtbaar te maken. Dit collageen hybridiserende peptide kan alleen binden aan collageenmoleculen als de karakteristieke drievoudige helix niet langer intact is als gevolg van denaturatie. Eerder werden met behulp van dit peptide hogere niveaus van gedenateerd collageen gevisualiseerd bij muizen met bleomycine-geïnduceerde longfibrose in vergelijking met controles. Wij hebben nu bevestigd dat longweefsel van patiënten met IPF ook meer gedenateerd collageen bevat, wat suggereert dat er uitgebreide herstructurering van het collageen plaatsvindt. Deze bevinding roept de vraag op of macrofagen *in vivo* ook in staat zijn om dit gedenateerde collageen te herkennen en erop te reageren. Daarom hebben we ook de niveaus van gedenateerd collageen in gedecellulariseerd longweefsel onderzocht en de IPF-gerelateerde hogere niveaus van structureel afwijkend collageen bleken te zijn behouden na decellularisatie. Deze bevinding bevestigt dat dit gedecellulariseerde longweefsel gebruikt kan worden om de respons van longmacrofagen op IPF-gerelateerde collageedenaturatie *in vitro* te bestuderen.

Een belangrijk probleem bij het bestuderen van interacties tussen macrofagen en de matrix is het onvolledige begrip van de polarisatie van macrofagen. Door de jaren heen groeide de algemene consensus van twee verschillende fenotypes (M1 vs. M2) naar een volledig spectrum van macrofaagactivering. Vooral de initiële mechanismen van macrofaagactivering, die uiterst relevant zijn bij interacties tussen macrofaag en matrix, zijn echter niet goed bestudeerd. Een ander probleem bij het onderzoeken van het effect van biochemische en biofysische ECM-eigenschappen op macrofaagpolarisatie is het ontbreken van *in vitro* systemen die de toepassing van en controle over biochemische en biofysische stimuli mogelijk maken. Het kweken van macrofagen op weefselkweekplastic levert bijvoorbeeld al een biofysische stimulus (een stijf oppervlak) op die de macrofaagrespons op een toegepaste biochemische stimulus kan beïnvloeden. In **Hoofdstuk 6** hebben we laten zien dat een op een optische pincet-gebaseerd systeem kan worden gebruikt om de activering van een enkele macrofaag na een bepaalde stimulus te bestuderen met een zeer hoge spatiotemporele resolutie. Door een enkele macrofaag in de optische pincet te vangen, kunnen we biofysische stimuli verwijderen die afkomstig zijn van een oppervlak of van contact met andere cellen. Het microfluidische systeem stelt ons in staat om de macrofaag te activeren met een biochemische stimulus, terwijl we de onmiddellijke reactie in beeld kunnen brengen met behulp van een confocale fluorescentiemicroscopie. Met deze aanpak hebben we kunnen aantonen dat macrofagen binnen enkele seconden reageren op PMA-stimulatie door de niveaus van reactieve zuurstofsoorten (ROS) te verhogen. Interessant genoeg was de kinetische respons van macrofagen in de optische pincet sneller dan de respons van macrofagen die werden geanalyseerd met behulp van gangbare technieken zoals flow cytometrie en fluorescentiemicroscopie. Aangezien de optische pincet zelf geen invloed had

op de hoeveelheid ROS, is het waarschijnlijk dat factoren zoals de aanwezigheid van een stijf celkweekoppervlak of cel-cel contacten verantwoordelijk zijn voor de vertraagde macrofaagrespons gemeten met behulp van de gevestigde technieken. Deze waarneming benadrukt nogmaals het belang van de micro-omgeving in macrofaagresponsen. In de toekomst zal dit op een optische pincet-gebaseerd systeem ons in staat stellen om de initiële reacties van macrofagen op losse (fibrose-gerelateerde) biochemische en biofysische stimuli te bestuderen en uiteindelijk de integratie van gelijktijdige stimuli te visualiseren.

Op basis van de huidige literatuur en dit proefschrift staat het vast dat macrofagen veranderingen in hun micro-omgeving kunnen waarnemen en vervolgens hun fenotype kunnen veranderen. Toekomstig onderzoek moet zich echter richten op een beter begrip van fibrose-gerelateerde ECM-veranderingen en macrofaagpolarisatie om de ontwikkeling van relevante modellen en daarmee de vertaalbaarheid van *in vitro* bevindingen te verbeteren. Het gebruik van meer functionele uitlezingen van macrofaagedrag, zoals hun matrix-afbrekende capaciteit of hun vermogen om myofibroblasten te stimuleren, zal opheldering geven of geïnduceerde veranderingen in polarisatie gunstig of nadelig zijn voor de fibrotische respons.

Terugkomend op de analogie van macrofagen als dirigenten van de wondgenezingsreactie zal een beter begrip van macrofaag-matrixinteracties en de daaropvolgende (anti-)fibrotische responsen ons helpen te bepalen of we de dirigent (macrofaag) van gehoorapparaten moeten voorzien (om de herkenning van en reactie op afwijkende ECM te verbeteren) of van oordopjes (om overmatige reacties te dempen of te voorkomen). Vanwege de universaliteit van de mechanismen waarvan tot nu toe is bewezen dat ze een rol spelen bij macrofaag-matrixinteracties zijn ongewenste systemische effecten te verwachten bij het moduleren van deze mechanismen. Het is daarom waarschijnlijk dat gelokaliseerde en macrofaag-specifieke behandelingsmethoden nodig zullen zijn om het gedrag van macrofagen in IPF en gerelateerde ziektebeelden succesvol te moduleren. Desalniettemin is eerst een beter begrip van fibrose-gerelateerde matrixveranderingen en functionele macrofaagpolarisatie vereist om de exacte rol van macrofaag-matrixinteracties in het orkestreren van de fibrotische respons te verduidelijken.

ABOUT THE AUTHOR

Gwenda F. Vasse was born in Hardenberg, The Netherlands on July 5th 1993. From 2011-2014, she studied Biology at the University of Groningen. She majored in Biomedical Sciences, with a minor in Pharmaceutical Sciences, and graduated cum laude. In 2014, she successfully applied for the selective research master Medical and Pharmaceutical Drug Innovation at the same university and obtained her degree cum laude in 2016. Her first research internship at the Department of Experimental Nephrology focused on the role of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 in viral spreading. During her second research internship, she started investigating the effect of extracellular matrix morphology and stiffness on macrophage function under supervision of Dr. Patrick van Rijn and Prof. Dr. Barbro Melgert in the Department of Biomedical and Engineering and the Department of Pharmacokinetics, Toxicology and Targeting. In the final months of her master studies, she wrote a research proposal to extend the work of her second research internship into a PhD project, which got funded by the Graduate School of Medical Sciences.

Besides her academic studies, Gwenda was active as clarinetist in the Northern Dutch Youth Orchestra (NNJO). As board member of the NNJO, she organized concert tours to Denmark, Italy and France.

Starting January 2021, she continued her academic career as postdoctoral researcher in the group of Prof. dr. Irene Heijink at the University Medical Center Groningen.

LIST OF PUBLICATIONS

W.T. Lollinga, R.H. de Wit, A. Rahbar, **G.F. Vasse**, B. Davoudi, A. Diepstra, A. Riezebos-Brilman, M.C. Harmsen, J.L. Hillebrands, C. Söderberg-Naucler, W.J. van Son, M.J. Smit, J.S. Sanders & J. van den Born (2016). Human Cytomegalovirus-Encoded Receptor US28 Is Expressed in Renal Allografts and Facilitates Viral Spreading in Vitro. *Transplantation*, 101(3), 531-540.

G.F. Vasse, P.T. Kühn, Q. Zhou, S.A. Bhusari, C. Reker-Smit, B.N. Melgert & P. van Rijn (2018). Collagen Morphology Influences Macrophage Shape and Marker Expression in Vitro. *Journal of Immunology and Regenerative Medicine*, 1, 13–20.

G.F. Vasse, M. Nizamoglu, H.I. Heijink, M. Schlepütz, P. van Rijn, M.J. Thomas, J.K. Burgess & B.N. Melgert (2021). Macrophage–Stroma Interactions in Fibrosis: Biochemical, Biophysical, and Cellular Perspectives. *Journal of Pathology*, DOI: 10.1002/path.5632

G.F. Vasse, P. Buzón, B.N. Melgert, W.H. Roos & P. van Rijn. Single Cell Reactomics: Real-Time Single-Cell Activation Kinetics of Optically Trapped Macrophages (2021). *Small Methods*, 5, 2000849

G.F. Vasse, L. van Os, M. de Jager, M.R. Jonker, T. Borghuis, L.T. van den Toorn, P. Jellema, E.S. White, P. van Rijn, M.C. Harmsen, H.I. Heijink, B.N. Melgert & J.K. Burgess. Adipose Stromal Cell-Secretome Counter-Acts Profibrotic Signals from IPF Lung Matrices. *Manuscript submitted*.

G.F. Vasse, A. Barcaru, P. van Rijn, M. Kwiatkowski & B.N. Melgert. Collagen Type I Alters the Proteomic Signature of Macrophages in a Collagen Morphology-Dependent Manner. *Manuscript in preparation*.

L. Ribovski, **G.F. Vasse**, M. Koster, P. van Rijn & I.S. Zuhorn. Effect of Co-Culture of Glioma Cells and Macrophages on the Interaction with Nanogels of Varying Stiffness. *Manuscript in preparation*.