

Origin versus context

Citation for published version (APA):

Ruder, A. V. (2023). *Origin versus context: defining key determinants of human macrophage function in health and disease*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20231031ar>

Document status and date:

Published: 01/01/2023

DOI:

[10.26481/dis.20231031ar](https://doi.org/10.26481/dis.20231031ar)

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.



9

Chapter 9

Summary

Samenvatting

Zusammenfassung

Cardiovascular disease weighs heavily on public health in nations at all economic levels as it is the leading cause of death worldwide. The most common cause of cardiovascular disease is atherosclerosis, an inflammatory disease that leads to the formation of atherosclerotic plaque in the artery wall. Atherosclerotic plaques can rupture, causing blood clots to form which can lead to myocardial infarction or stroke. Inflammation plays an important role in atherosclerosis and underlies its development. One of the main immune cells involved in the development of atherosclerosis is the macrophage (M Φ) which can exert a repertoire of functions in response to local factors. However, characterisation of the cells' function by laboratory experiments have been incomplete: so far, most studies considered a single factor, rather than the usual cocktail that M Φ encounter in the living body. Moreover, they often overlooked functional changes that may have been induced at the level of the M Φ precursor cell, the monocyte, or during the differentiation of monocyte into M Φ . In this thesis, we examined M Φ function and how it is affected by monocytic origin, growth factors, and complex (mixtures of) factors in the (direct) surrounding of the cell.

M Φ function may partly mirror the set of functional traits their monocytic precursors possess. In **Chapter 2**, we discussed the diversity of monocytes which is transcending the prevailing tripartite classification, considering recent technological advances to study single cells. Moreover, we discussed associations with cardiovascular disease, identifying the strongest association with one particular type of monocyte, so called "intermediate" monocytes. In **Chapter 3**, we studied the functional traits of M Φ derived from three known types of monocytes, namely "classical," "intermediate", and "non-classical" monocytes. We observed clear differences in cell size, shape, and function between M Φ that were stemming from these three monocyte classes, demonstrating that the monocyte origin is important for M Φ function.

M Φ function may also be influenced by the culture density in laboratory experiments. In **Chapter 4**, we investigated cell density as a modulator of human M Φ function. We observed a profound effect of culture density on a multitude of human M Φ functions, using two different types of experimental M Φ models. Moreover, we found evidence for growth pattern-associated functional adaptations in one of the models, namely THP-1 M Φ , and show substantial variability in the functional traits of M Φ isolated from different human donors. Given the bias that may be introduced by ignoring cell density differences, our findings demonstrate the need to account for differences in cell density in M Φ laboratory experiments.

M Φ function may be established during monocyte-to-M Φ differentiation. In **Chapter 5**, we used the growth factors macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) to differentiate human monocytes to M Φ and studied their differentiation track. We identified changes in function and genetic information that we could relate to the differentiation trajectory itself or to the growth factor. We found these growth factor-induced changes to be established early in the differentiation process.

Next to differences, we also found common changes related to cell growth and differentiation induced by M-CSF or GM-CSF. In addition, we discovered M-CSF to be the main growth factor in atherosclerotic lesions. Plaque M Φ were more similar to M-CSF-grown M Φ than to GM-CSF-grown M Φ , especially later in the disease development. Moreover, newly recruited inflammatory M Φ and lipid-containing M Φ (also called foam cells) were mirroring the gene profile of M-CSF-derived M Φ .

M Φ respond to nanoparticles used as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI). In **Chapter 6**, we revealed a cell death-inducing effect of ferumoxide and ferumoxtran, two iron oxide nanoparticles, on lipid-containing M Φ . This effect was absent in M Φ not containing excess lipids, demonstrating foam cells to respond to environmental stimuli differently and to be more susceptible to stressors. Interestingly, a newer formulation of nanoparticles, ferumoxytol, did not induce cell death in foam cell M Φ , which was neither attributable to particle coating nor particle size.

M Φ respond to disease environment. In **Chapter 7**, we stimulated M Φ with serum of COVID-19 patients at hospitalisation or at 3-month follow-up, or serum of healthy subjects. We showed that M Φ react to the systemic COVID-19 disease environment reflected in the serum by adapting their functions to a higher activation status. Moreover, COVID-19 serum-stimulated M Φ instructed fibroblasts, cells which contribute to the formation of connective tissue, to multiply. Based on functional differences in the uptake of particles and lipids by M Φ , and the production of collagen by fibroblasts, we could predict the need for patients to be admitted to the intensive care unit (ICU) and/or determine which patients would be suffering from respiratory failure. Certain functional changes were found to persist even at 3-month follow-up, including increased particle uptake and cell death, and a more stretched appearance.

In **Chapter 8**, we summarised the main findings presented in thesis and discussed their implications for future research, their limitations, and the potential for drug screening and therapeutic approaches. Altogether, the findings presented in this thesis suggest that M Φ function is not only determined by environmental stimuli encountered locally, but also by the systemic environment as well as monocytic origin and the growth factors driving monocyte-to-M Φ differentiation.

Hart- en vaatziekten zijn wereldwijd de belangrijkste doodsoorzaak en wegen daarom zwaar op de volksgezondheid in landen van alle economische niveaus. De meest voorkomende oorzaak van hart- en vaatziekten is atherosclerose, een ontstekingsziekte die leidt tot de vorming van atherosclerotische plaque in de slagaderwand. Atherosclerotische plaques kunnen scheuren, waardoor zich bloedstolsels vormen die kunnen leiden tot een hartinfarct of een beroerte. Ontsteking speelt een belangrijke rol bij atherosclerose en ligt ten grondslag aan de ontwikkeling ervan. Een van de belangrijkste immuuncellen die bij de ontwikkeling van atherosclerose betrokken is, is de macrofaag (M Φ), die een breed repertoire van functies kunnen uitoefenen in reactie op lokale factoren. De karakterisering van de functie van deze cellen door middel van laboratoriumexperimenten is tot nu toe echter onvolledig: doorgaans keek men naar één enkele factor, in plaats van de gebruikelijke cocktail die M Φ in het levende lichaam tegenkomen. Daarenboven zijn functionele veranderingen over het hoofd gezien die al geïnduceerd kunnen zijn op het niveau van de M Φ voorlopercel, de monocyt, of tijdens de differentiatie van monocyt tot M Φ . In dit proefschrift onderzochten wij de M Φ functie en hoe deze wordt beïnvloed door monocyttaire oorsprong, groeifactoren, en complexe (mengsels van) factoren in de (directe) omgeving van de cel.

M Φ -functie kan deels een afspiegeling zijn van de set van functionele eigenschappen die hun monocytische voorlopers bezitten. In **hoofdstuk 2** bespraken wij de diversiteit van monocyten die de gangbare driedelige classificatie overstijgt, gezien de recente technologische vooruitgang die het mogelijk heeft gemaakt om individuele cellen te bestuderen. Bovendien bespraken wij de associaties met hart- en vaatziekten, waarbij wij de sterkste associatie met één bepaald type monocyt identificeerden, de zogenaamde "intermediaire" monocyten. In **hoofdstuk 3** bestudeerden wij de functionele kenmerken van M Φ afkomstig van drie bekende typen monocyten, namelijk "klassieke", "intermediaire" en "niet-klassieke" monocyten. Wij zagen duidelijke verschillen in celgrootte, vorm en functie tussen M Φ die afkomstig waren van deze drie monocytensorten, waaruit blijkt dat de monocytensort van belang is voor de M Φ -functie.

De M Φ -functie kan ook worden beïnvloed door de kweekdichtheid in laboratoriumexperimenten. In **hoofdstuk 4** onderzochten wij de celdichtheid als modulator van de menselijke M Φ -functie. Wij constateerden een duidelijk effect van de kweekdichtheid op verschillende menselijke M Φ -functies, met behulp van twee verschillende soorten experimentele M Φ -modellen. Bovendien vonden wij bewijs voor groeipatroon-geassocieerde functionele aanpassingen in een van de modellen, namelijk THP-1 M Φ , en tonen wij aanzienlijke variabiliteit in de functionele eigenschappen van M Φ geïsoleerd van verschillende menselijke donoren. Gezien de bias die kan ontstaan door het negeren van verschillen in celdichtheid, tonen onze bevindingen aan dat rekening moet worden gehouden met verschillen in celdichtheid in M Φ -laboratoriumexperimenten.

M Φ -functie kan worden vastgesteld tijdens de differentiatie van monocyt naar M Φ . In **hoofdstuk 5** gebruikten wij de groeifactoren M-CSF of GM-CSF om menselijke monocyt te differentiëren tot M Φ en bestudeerden wij hun differentiatietraject. Wij identificeerden veranderingen in functie en in gen expressie die wij in verband konden brengen met het differentiatietraject zelf of met de groeifactor. Wij vonden dat deze door de groeifactor geïnduceerde veranderingen vroeg in het differentiatieproces tot stand kwamen. Naast verschillen vonden wij ook gelijkaardige veranderingen met betrekking tot celgroei en differentiatie geïnduceerd door M-CSF of GM-CSF. Bovendien ontdekten we dat M-CSF de belangrijkste groeifactor is in atherosclerotische laesies. Plaque M Φ leken meer op M-CSF-gegroeide M Φ dan op GM-CSF-gegroeide M Φ , vooral later in de ziekteontwikkeling. Bovendien spiegelde ook pas gerekruteerde inflammatoire M Φ en lipide bevattende M Φ (ook schuimcellen genoemd) het genprofiel van M-CSF-afgeleide M Φ .

M Φ reageren op nanodeeltjes die worden gebruikt als contrastmiddel bij MRI. In **hoofdstuk 6** toonden we een celdood-inducerend effect aan van ferumoxide en ferumoxtran, twee ijzeroxide nanodeeltjes, op lipide-bevattende M Φ . Dit effect was afwezig in M Φ die geen overtollige lipiden bevatten, wat aantoont dat schuimcellen anders reageren op omgevingsstimuli en gevoeliger zijn voor stressoren. Interessant is dat een nieuwere formulering van nanodeeltjes, ferumoxytol, geen celdood induceerde in schuimcellen, hetgeen niet te wijten was aan de coating of de grootte van de deeltjes.

M Φ reageren op de ziekteomgeving. In **hoofdstuk 7** hebben wij M Φ gestimuleerd met serum van COVID-19-patiënten bij opname in het ziekenhuis of bij 3 maanden follow-up, of met serum van gezonde proefpersonen. Wij toonden aan dat de M Φ reageren op de systemische COVID-19-ziekteomgeving die in het serum tot uiting komt, door hun functies aan te passen en actiever te worden. Bovendien vonden wij dat M Φ cellen die bijdragen tot de vorming van bindweefsel, fibroblasten genaamd, opdracht geven zich te vermenigvuldigen. Op basis van functionele verschillen in de opname van deeltjes en lipiden door M Φ , en de productie van collageen door fibroblasten, konden wij de noodzaak van opname op de IC en/of het risico op ademhalingsfalen voorspellen. Bepaalde functionele veranderingen bleken zelfs na 3 maanden follow-up te blijven bestaan, waaronder verhoogde deeltjesopname en celdood, en een meer uitgerekt uiterlijk.

In **hoofdstuk 8** vatten we de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift samen en bespraken we de implicaties ervan voor toekomstig onderzoek, alsook de beperkingen en het potentieel voor het screenen van geneesmiddelen en therapeutische benaderingen. Al met al suggereren de bevindingen in dit proefschrift dat de M Φ -functie niet alleen wordt bepaald door omgevingsstimuli die zich lokaal voordoen, maar ook door de systemische omgeving, de monocyttaire oorsprong en de groeifactoren die de monocyt-naar-M Φ -differentiatie aansturen.

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache und belasten daher die Volksgesundheit in Ländern aller Wirtschaftsniveaus schwer. Die häufigste Ursache von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Atherosklerose, eine entzündliche Erkrankung, die zur Bildung von atherosklerotischen Plaques in der Arterienwand führt. Atherosklerotische Plaques können reißen, wodurch sich Blutgerinnsel bilden, die zu einem Herzinfarkt oder Schlaganfall führen können. Entzündungen spielen bei der Atherosklerose eine wichtige Rolle und liegen ihrer Entstehung zugrunde. Eine der wichtigsten Immunzellen, die an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt ist, ist der Makrophage (MΦ), der als Reaktion auf lokale Faktoren ein breites Repertoire an Funktionen ausüben kann. Die Charakterisierung der Funktionen von MΦ durch Laborexperimente ist bislang allerdings unvollständig: In den meisten Studien wurde bisher nur ein einziger Faktor anstelle einer Mischung aus Faktoren betrachtet, dem MΦ im lebenden Körper üblicherweise ausgesetzt sind. Darüber hinaus wurden funktionelle Veränderungen, die möglicherweise auf der Ebene der MΦ-Vorläuferzelle, dem Monozyten, oder während der Differenzierung von Monozyten zu MΦ ausgelöst wurden, nicht beachtet. In dieser Dissertation haben wir untersucht, wie die MΦ-Funktion durch den monozytären Ursprung, durch Wachstumsfaktoren sowie komplexe (Mischungen von) Faktoren in der (unmittelbaren) Umgebung der Zelle beeinflusst wird.

Die MΦ-Funktion kann teilweise die funktionellen Eigenschaften ihrer monozytären Vorläufer widerspiegeln. In **Kapitel 2** haben wir, unter Berücksichtigung der jüngsten technologischen Fortschritte bei der Untersuchung einzelner Zellen, die Vielfalt der Monozyten erörtert, die über die aktuell geltende Dreiteilung hinausgeht. Des Weiteren haben wir Assoziationen mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen dargelegt, wobei die stärkste Assoziation mit einem bestimmten Monozytentyp, den so genannten "intermediären" Monozyten, festgestellt wurde. In **Kapitel 3** untersuchten wir die funktionellen Eigenschaften von MΦ, die von den drei geläufigen Typen von Monozyten, den "klassischen", "intermediären" und "nicht-klassischen" Monozyten, abstammen. Wir beobachteten deutliche Unterschiede in Zellgröße, -form und -funktion zwischen MΦ, die sich aus diesen drei Monozytentypen entwickelten, was die Bedeutung der Monozytenherkunft für die MΦ-Funktion zeigt.

Die MΦ-Funktion kann auch durch die Zelldichte in Laborexperimenten beeinflusst werden. In **Kapitel 4** haben wir die Zelldichte als Modulator der menschlichen MΦ-Funktion untersucht. Wir beobachteten eine tiefgreifende Auswirkung der Zelldichte auf eine Vielzahl menschlicher MΦ-Funktionen, wobei wir zwei verschiedene Arten von experimentellen MΦ-Modellen verwendeten. Darüber hinaus fanden wir Hinweise auf wachstumsmusterbedingte funktionelle Anpassungen in einem der Modelle, nämlich THP-1 MΦ, und zeigen eine erhebliche Variabilität in den funktionellen Merkmalen von MΦ, die von verschiedenen menschlichen Spendern isoliert wurden. Angesichts der Verzerrung, die durch die Nichtberücksichtigung von Unterschieden in der Zelldichte entstehen kann, zeigen unsere Ergebnisse, dass Unterschiede in der Zelldichte bei MΦ-Laborversuchen berücksichtigt werden müssen.

Die M Φ -Funktion kann während der Differenzierung von Monozyten zu M Φ entstehen. In **Kapitel 5** verwendeten wir die Wachstumsfaktoren M-CSF oder GM-CSF, um menschliche Monozyten zu M Φ zu differenzieren und untersuchten den Differenzierungsverlauf. Wir stellten Veränderungen in der Funktion und den genetischen Informationen fest, die wir mit dem Differenzierungsprozess selbst oder dem jeweiligen Wachstumsfaktor in Verbindung bringen konnten. Zudem stellten wir fest, dass diese wachstumsfaktorinduzierten Veränderungen bereits früh im Differenzierungsprozess auftreten. Neben Unterschieden fanden wir auch ähnliche Veränderungen im Zusammenhang mit Zellwachstum und -differenzierung, die durch M-CSF oder GM-CSF ausgelöst wurden. Darüber hinaus entdeckten wir, dass M-CSF der wichtigste Wachstumsfaktor in atherosklerotischen Läsionen ist. Plaque-M Φ ähnelten mehr den durch M-CSF differenzierten M Φ als den durch GM-CSF differenzierten M Φ , insbesondere im späteren Verlauf der Erkrankung. Außerdem spiegelten neu rekrutierte entzündliche M Φ und lipidhaltige M Φ (auch Schaumzellen genannt) das Genprofil von M-CSF-differenzierten M Φ wider.

M Φ reagieren auf Nanopartikel, die als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT) verwendet werden. In **Kapitel 6** zeigten wir eine zelltodauslösende Wirkung von Ferumoxid und Ferumoxtran, zwei Eisenoxid-Nanopartikeln, auf lipidhaltige M Φ . Dieser Effekt war bei M Φ , die keine überschüssigen Lipide enthielten, nicht vorhanden, was zeigt, dass Schaumzellen unterschiedlich auf Umweltreize reagieren und anfälliger für Stressfaktoren sind. Interessanterweise löste eine neuere Formulierung von Nanopartikeln, Ferumoxytol, keinen Zelltod in Schaumzellen-M Φ aus, was weder auf die Partikelbeschichtung noch auf die Partikelgröße zurückzuführen war.

M Φ reagieren auf das Krankheitsumfeld. In **Kapitel 7** stimulierten wir M Φ mit dem Serum von COVID-19-Patienten, das bei der Aufnahme ins Krankenhaus oder bei der dreimonatigen Nachbeobachtung abgenommen wurde, oder mit dem Serum gesunder Personen. Wir konnten zeigen, dass M Φ auf das systemische COVID-19-Krankheitsumfeld, das sich im Serum widerspiegelt, reagieren, indem sie ihre Funktionen an einen höheren Aktivierungsstatus anpassen. Darüber hinaus veranlassten COVID-19-serumstimulierte M Φ wiederum Fibroblasten, Zellen, die zur Bildung von Bindegewebe beitragen, sich zu vermehren. Anhand der funktionellen Unterschiede bei der Aufnahme von Partikeln und Lipiden durch M Φ und der Produktion von Kollagen durch Fibroblasten konnten wir vorhersagen, ob Patienten auf die Intensivstation eingewiesen werden mussten und/oder welche Patienten an Atemversagen leiden würden. Bestimmte funktionelle Veränderungen blieben auch nach drei Monaten bestehen, darunter eine erhöhte Partikelaufnahme und ein vermehrter Zelltod sowie ein gestreckteres Erscheinungsbild der M Φ .

In **Kapitel 8** fassten wir die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit zusammen und erörterten ihre Bedeutung für die künftige Forschung, ihre Grenzen, und das Potenzial für Medikamenten-

Screening und therapeutische Ansätze. Insgesamt deuten die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass die M Φ -Funktion nicht nur durch lokal auftretende Umweltreize bestimmt wird, sondern auch durch die systemische Umgebung sowie die monozytäre Herkunft und die Wachstumsfaktoren, die die Differenzierung von Monozyten zu M Φ vorantreiben.