



Universiteit
Leiden
The Netherlands

ROS-producing macrophages in immune modulation

Kraaij, M.D.

Citation

Kraaij, M. D. (2014, September 24). *ROS-producing macrophages in immune modulation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/28767>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/28767>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/28767> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Kraaij, Marina

Title: ROS-producing macrophages in immune modulation

Issue Date: 2014-09-24

Appendix

Nederlandse samenvatting

De afgelopen jaren is het inzicht in de biologische rol van zuurstofradicalen ('reactive oxygen species', ROS) dramatisch veranderd. Over het algemeen werd er gedacht dat ROS alleen maar schadelijk waren, maar intussen is duidelijk geworden dat ROS ook functioneren als belangrijke fysiologische regulatoren van intracellulaire signaaltransductie routes. ROS spelen een rol in antigeen presentatie en er is aangetoond dat waterstofperoxide, een belangrijke vorm van ROS, T cel activatie kan remmen. Ten slotte is aangetoond dat DA ratten met een verminderde ROS productie gevoeliger waren voor artritis, en dat ook dit gepaard ging met ene veranderde T cel activatie. De reden voor deze verminderde ROS productie kwam door een polymorfisme in het *Ncf1* gen. Dit *Ncf1* gen codeert voor het eiwit p47^{phox}, wat een van de belangrijkste eiwitten is van het NADPH oxidase complex (NOX2). Dit NOX2 complex produceert de ROS superoxide. Muizen die een functioneel NOX2 eiwit p47^{phox} exclusief in hun macrofagen tot expressie konden brengen, waren beschermd tegen artritis. ROS afkomstig van macrofagen lijken dus een belangrijke rol te spelen en daarom wilden wij dit onderwerp in dit proefschrift verder bestuderen door verschillende macrofaag-subsets en het immuunmodulerende potentieel van ROS geproduceerd door macrofagen te onderzoeken.

Hoofdstuk 1 geeft algemene achtergrondinformatie met betrekking tot macrofagen. Daarnaast wordt er een overzicht van de verschillende soorten macrofagen gegeven. Ook wordt de activatie van macrofagen en de rol van macrofagen tijdens inflammatie besproken. Verder wordt er achtergrondinformatie over ROS gegeven. Ook wordt het NOX2 complex beschreven en de gevolgen van mutaties in dit complex. Ten slotte wordt in dit overzicht dieper ingegaan op de potentieel immuunmodulerende rol van ROS.

In **Hoofdstuk 2** onderzochten we de ROS-producerende capaciteit van humane macrofagen. De anti-inflammatoire macrofagen (gedifferentieerd met M-CSF; Mph2) hebben een hoge ROS productie na PMA stimulatie, terwijl dendritische cellen (gedifferentieerd met GM-CSF en IL-4) hoegenaamd geen ROS produceren. In een 'mixed lymphocyte reaction' (MLR) waarin T cellen daarnaast geactiveerd werden met anti-CD3/anti-CD28, stimuleerden dendritische cellen de T cel proliferatie, terwijl Mph2 de T cel proliferatie juist onderdrukten. Deze remming bleek ROS-afhankelijk te zijn, want na toevoeging van de NOX2-remmer apocynin werd de remming opgeheven. De macrofagen induceerden regulatoire T cellen (CD4+CD25+FoxP3+) nadat CD4+CD25-T cellen aan deze cellen waren blootgesteld. Na toevoeging van apocynin bleek deze inductie ROS-afhankelijk te zijn. Dit konden we bevestigen met Mph2 afkomstig van patiënten met 'chronic granulomatous disease' (CGD) die een mutatie in NOX2 hebben, waarbij we in afwezigheid van ROS productie opnieuw verminderde inductie van regulatoire T cellen en meer T cel activatie

observeerden. Verder bestudeerden we de rol van ROS *in vivo* door de T cel activatie te bestuderen in een ratmodel met de 'delayed-type hypersensitivity' (DTH)-respons als uitleessysteem. Hieruit bleek dat het primen van naïeve Lewis ratten met Mph2 van DA ratten met een normale ROS-producerende capaciteit leidde tot een sterkere inductie van regulatoire T cel in vergelijking met het primen met Mph2 van DA ratten met een lage ROS productie. Bovendien was de T cel activatie lager met normaal ROS-producerende Mph2 gezien de verminderde DTH-respons in vergelijking met laag ROS-producerende Mph2. Deze data tonen aan dat ROS geproduceerd door Mph2 een rol spelen in de inductie van regulatoire T cellen.

In **Hoofdstuk 3** hebben we onderzocht of medicijnen die het immuunsysteem onderdrukken een negatief effect kunnen hebben op de ROS productie van macrofagen. Dit zou namelijk een nadelig effect kunnen hebben op de mogelijkheid om macrofagen als therapie te gebruiken in combinatie met de huidige therapieën. We vergeleken hierbij de pro-inflammatoire macrofaag (gedifferentieerd met GM-CSF; Mph1) met de anti-inflammatoire Mph2. Terwijl Mph2 een hoge ROS productie hebben na PMA stimulatie, vertoonden Mph1 juist een lage ROS-producerende capaciteit. Verschillende immuunsuppressiva (cyclosporine, tacrolimus, dexamethason, rapamycine, en mycofenolaat mofetil) werden aan de Mph1 en Mph2 toegevoegd. Wanneer de medicijnen werden toegevoegd op dag 6 van kweek, het moment dat de macrofagen gedifferentieerd zijn, was er geen effect op de ROS-producerende capaciteit aantoonbaar. Echter, de medicijnen hadden wel een effect op de ROS productie wanneer toegediend tijdens het differentiëren van monocyt-naar-macrofaag (gedurende de eerste 6 dagen). De medicijnen cyclosporine, tacrolimus, dexamethason en mycofenolaat mofetil verhoogden de capaciteit van Mph2 om ROS te produceren, terwijl rapamycine een remmend effect had. Hoewel de verschillende medicijnen geen effect hadden op de ROS-producerende capaciteit van Mph1, die om te beginnen al laag was, verhoogde dexamethason wel de ROS productie van dendritische cellen. Ook zorgde dexamethason voor een toename in de expressie van $p47^{phox}$ op zowel mRNA als eiwit niveau. Functioneel versterkte dexamethason behandeling van Mph2 de suppressie van de productie van IFN-gamma en IL-4 door T cellen, hoewel er geen effect te zien was op de proliferatie van T cellen. Ten slotte zorgden dexamethason-injecties *in vivo* voor toename van ROS productie en tot verhoogde inductie van regulatoire T cellen, met name in de DA ratten met normaal ROS-producerende capaciteit. Hiermee tonen we een nieuw anti-inflammatoir mechanisme van dexamethason aan.

In **Hoofdstuk 4** onderzochten we de productie van ROS in verschillende Mph2 subsets en bestudeerden de rol van ROS geproduceerd door Mph2 op T cel activatie. Monocyten kunnen op diverse manieren gedifferentieerd worden tot Mph2. Deze Mph2 hebben overeenkomende kenmerken, maar zijn fenotypisch en functioneel toch verschillend van elkaar. In dit hoofdstuk hebben wij gekeken naar Mph2 gedifferentieerd met respectievelijk M-CSF (Mph2), IL-4

(Mph2a) en IL-10 (Mph2c). Mph2 en Mph2c lijken veel op elkaar: hoge CD14 en CD163 expressie, lage DC-SIGN expressie, lage productie van de pro-inflammatoire cytokines IL-6 en IL-12p40, terwijl Mph2a het tegenovergestelde laat zien. Ook functioneel zit er een verschil tussen de drie verschillende macrofagen: Mph2a is de meest potente T cel activator, terwijl Mph2c de slechtste is. De ROS-producerende capaciteit van Mph2 is het hoogst, Mph2c heeft een gemiddelde ROS producerende capaciteit, terwijl Mph2a nauwelijks in staat zijn om ROS te produceren. Om te onderzoeken of er een omgekeerde correlatie was tussen de ROS-producerende capaciteit en de T cel stimulatorische capaciteit, hebben we gebruik gemaakt van de NOX2-remmer DPI. Interessant genoeg zagen we dat DPI de T cel proliferatie en IFN-gamma productie remde. Verder onderzoek toonde aan dat het effect van DPI in de MLR niet op het niveau van de T cel plaats vond, maar juist bij de macrofagen. De interactie tussen de macrofaag en T cel, bepalend voor de activatie van de T cel, vindt plaats op verschillende niveaus waaronder MHC moleculen, co-stimulatorische moleculen en cytokine productie. DPI behandeling van Mph had geen effect op de expressie van MHC class 2 molecuul HLA-DR en ook geen effect op het co-stimulatorische molecuul CD86. Er was echter wel een remmend effect op de productie van de cytokines IL-12p40 en IL-10, maar niet IL-6, wanneer de Mph gestimuleerd werden met CD40L. DPI onderdrukte ook de IL-12p40 en IL-10 productie van Mph2, Mph2a, en Mph2c na LPS stimulatie. Deze remming van de cytokine productie door Mph kan bijdragen aan de verminderde capaciteit om T cellen te activeren. Dus we zien dat ROS een associatie heeft met de cytokine productie, maar meer experimenten zijn nodig om het volledige mechanisme te kunnen ontrafelen.

In **Hoofdstuk 5** hebben we de consequenties onderzocht van NOX2-gemedieerde ROS productie in een experimenteel model van chronische ontsteking in een transplantaat. Hiervoor hebben we een niertransplantatiemodel gebruikt met als donor Lewis ratten en als ontvanger DA.Ncf1^{DA/DA} en DA.Ncf1^{E3/E3} ratten, die alleen verschillen in de NOX2-producerende capaciteit van hun fagocyten. We waren hierdoor in staat het effect te onderzoeken van ROS op de inflammatoire respons in de getransplanteerde nier. Een week na de transplantatie van de nier werd de contralaterale nier verwijderd, waarna de ratten op dag 30 werden opgeofferd. We zagen dat 4 weken na transplantatie de creatinine en ureum waarden verhoogd waren ten opzichte van de normaalwaarden. Ook waren de albumine waarden in de urine significant verhoogd. Dit bevestigde dat we naar een model keken met een chronisch nierfunctie verlies. Schade in de getransplanteerde nier werd inderdaad bevestigd door op weefsel niveau een verhoogde mate van aankleuring van de schademarkers KIM-1 aan te tonen. Daarnaast werd het weefsel gekarakteriseerd door een zeer sterke influx van ontstekingscellen, aangetoond met de leukocytenmarker CD45. Voor al deze parameters was er geen verschil aantoonbaar tussen de ontvanger stammen met een verschillende ROS producerende capaciteit. Om een beter inzicht te krijgen hebben we ook gekeken naar verschillende

typen infiltrerende cellen. Verschillende subsets van myeloïde cellen waren aantoonbaar (aangetoond met antilichamen tegen OX42, ED1, ED2), maar de hoeveelheid aankleuring was niet verschillend. Er was ook geen significant verschil in de hoeveelheid regulatoire T cellen (aangetoond met een antilichaam tegen FoxP3). Wel was er een significant verschil in de T cel aankleuring (R73), waarbij er minder T cellen aanwezig waren in de DA.*Ncf1*^{E3/E3} ratten in vergelijking met DA.*Ncf1*^{DA/DA} ratten. Deze data suggereren een onderdrukkend effect van ROS op T cel infiltratie, terwijl er geen effect op de andere immuuncellen in het transplantaat werd gezien.

Tenslotte wordt in **Hoofdstuk 6** een overzicht gegeven van de studies beschreven in dit proefschrift waarin we verschillende facetten hebben bestudeerd hoe ROS een rol zouden kunnen spelen in de regulatie van een immuunrespons. Daarnaast bespreken we aanvullende gegevens over potentiële moleculaire mechanismen waarmee ROS zowel op eiwit- als op gen niveau hun effecten zouden kunnen bewerkstelligen. We hebben duidelijk aangetoond dat ROS-producerende Mph2 in staat zijn regulatoire T cellen te induceren, en identificeerden een ROS-gemedieerd effect op T cel infiltratie in een niertransplantatiemodel. Naast het feit dat ROS als boodschapper tussen antigeen presenterende cellen en T cellen kan fungeren, toonden we ook duidelijk aan dat ROS een belangrijke plaats hebben in de functionele capaciteiten van verschillende Mph subsets. Naast de bestaande gegevens over de belangrijke plaats van ROS in oxidatieve stress en andere pro-inflammatoire processen, hebben de huidige studies nieuwe inzichten opgeleverd over de 'andere kant' van ROS en de betrokkenheid bij immuunregulerende processen. Het verder ontrafelen van deze complexe, en soms tegenstrijdige processen, zal een uitdaging zijn voor de komende periode.

Dankwoord

Tijdens mijn sollicitatiegesprek kreeg ik te horen dat ik was uitgekozen om te beginnen aan het promotieonderzoek wat beschreven is in dit proefschrift. Nu is het zover, mijn proefschrift is af! Dit heb ik niet alleen kunnen volbrengen en daarom wil ik graag een aantal mensen bedanken.

Allereerst wil ik Cees en Kyra bedanken. Kyra, jouw directe begeleiding in de eerste twee jaar van mijn promotieonderzoek en onze nauwe samenwerking heeft mij veel geholpen. Na je vertrek ben je steeds betrokken geweest bij het werk en ik wil je bedanken voor je altijd snelle reacties op de vele e-mails die zijn langsgeslagen. Ook heb ik veel kunnen leren van jouw uitgebreide kennis. Cees, jou wil ik hartelijk bedanken voor het overnemen van mijn dagelijkse begeleiding in de laatste jaren. Jouw opbouwende kritiek heeft er aan bijgedragen dat alles toch tot een goed einde is gekomen.

Sandra en Karin, jullie wil ik bedanken voor de prettige samenwerking in de afgelopen jaren. Ik heb ontzettend veel van jullie geleerd! Uiteraard ook bedankt voor al jullie hulp met het voor elkaar krijgen van de resultaten.

Daarnaast wil ik Danielle, Ria en Nicole bedanken die mij met raad en soms met daad bijstonden. Verder wil ik ook de overige mensen van het nierziekten lab (Ethan, Karen, en alle anderen) en de vasculaire nefrologie lab (Eric, Ruben, Annemarie, en alle anderen) bedanken voor de hulp en de gezellige tijd op het werk.

Ik wil ook mijn kamergenoten Pieter, Hetty, Joe, Juha, Jeetindra en Jason bedanken voor alle lol en de vele grappen die plaatsvonden. Hierdoor was het altijd weer een verrassing wat er die dag zou gebeuren. Ook een speciaal bedankje voor mijn ex-kamergenoot Roelof die de lay-out verzorgd heeft van dit proefschrift.

Ook was er plezierige samenwerking met de afdeling Immunohematologie en Bloedtransfusie van het LUMC met Peter van Veelen, George Janssen en Michael Eikmans.

Tenslotte wil ik graag mijn familie bedanken. Suzanne en Deborah, bedankt voor alle ontspannende en leuke momenten naast het werk. Pap en mam, dat ik altijd mijn hart moest volgen en doen wat ik het liefst wilde, bedankt voor jullie steun.

Curriculum vitae

De schrijver van het proefschrift, Marina Kraaij, werd geboren op 28 december 1984 te Hillegom. In 2003 behaalde zij het VWO diploma aan het Fioretti college te Lisse. In datzelfde jaar begon zij met de studie Biomedische Wetenschappen aan de Universiteit Leiden. Tijdens deze studie verrichtte zij een Bachelor onderzoeksstage op de afdeling Infectieziekten van het LUMC te Leiden onder supervisie van Dr. P.H. Nibbering. Tijdens deze stage deed zij onderzoek naar de antimicrobiele en immuunmodulerende activiteiten van genetische varianten van humaan lactoferrine. De eerste Master onderzoeksstage tijdens deze opleiding verrichtte zij op de afdeling Pathologie van het LUMC te Leiden onder supervisie van Dr. N.F. de Miranda. Tijdens deze stage werd onderzoek gedaan naar de activatie van hypoxia in darmtumoren. De afsluitende Master onderzoeksstage tijdens deze opleiding verrichtte zij op de afdeling Cellular Medicine in de Musculoskeletal Research Group van de Newcastle University te Newcastle onder supervisie van Prof. Dr. J.M. van Laar. Tijdens deze stage werd onderzoek gedaan naar de rol van B-cellen in systemische sclerose. De studie Biomedische Wetenschappen werd afgesloten in 2008. Aansluitend hierop begon zij in september 2008 aan een Nierstichting-gefinancierd promotieonderzoek getiteld 'Inducing T cell tolerance via macrophage-derived radicals: a radical way to prevent transplant rejection' op de afdeling Nierziekten van het LUMC onder de supervisie van Dr. K.A. Gelderman en Prof. Dr. C. van Kooten. De resultaten van het promotieonderzoek zijn beschreven in dit proefschrift. In 2013 verrichtte zij postdoctoraal onderzoek op de afdeling Inwendige Geneeskunde, sectie Immunologie en Transplantatie, van het Erasmus MC te Rotterdam waar onderzoek werd gedaan naar de rol van monocyten in transplantatie in de onderzoeksgroep van Dr. A.T. Rowshani. Vanaf 2014 verricht zij postdoctoraal onderzoek op de afdeling Infectieziekten en Immunologie, sectie Moleculaire Afweer, op de faculteit Diergeneeskunde van de universiteit Utrecht te Utrecht met als onderwerp de immuunmodulerende mechanismes van de kip host defense peptide cathelicidin-2 in de onderzoeksgroep van Prof. Dr. H.P. Haagsman.

Bibliography

Kraaij MD, van Laar JM. The role of B cells in systemic sclerosis. *Biologics*. 2008.

Kraaij MD, Savage ND, van der Kooij SW, Koekkoek K, Wang J, van den Berg JM, Ottenhoff TH, Kuijpers TW, Holmdahl R, van Kooten C, Gelderman KA. Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010.

Kraaij MD, van der Kooij SW, Reinders ME, Koekkoek K, Rabelink TJ, van Kooten C, Gelderman KA. Dexamethasone increases ROS production and T cell suppressive capacity by anti-inflammatory macrophages. *Mol Immunol*. 2011.

Hügler T, O'Reilly S, Simpson R, **Kraaij MD**, Bigley V, Collin M, Krippner-Heidenreich A, van Laar JM. Tumor necrosis factor-costimulated T lymphocytes from patients with systemic sclerosis trigger collagen production in fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2013.

Kraaij MD, Koekkoek KM, van der Kooij SW, Gelderman KA, van Kooten C. Subsets of human type 2 macrophages show differential capacity to produce reactive oxygen species. *Cell Immunol*. 2013.

Vereyken EJ*, **Kraaij MD***, Baan CC, Rezaee F, Weimar W, Wood KJ, Leenen PJ, Rowshani AT. A shift towards pro-inflammatory CD16+ monocyte subsets with preserved cytokine production potential after kidney transplantation. *PLoS One*. 2013.

* shared first author

Kraaij MD, Koekkoek KM, Gelderman KA, van Kooten C. The NOX2-mediated ROS producing capacity of recipient cells is associated with reduced T cell infiltrate in an experimental model of chronic renal allograft inflammation. *Transpl Immunol*. 2014.

Kraaij MD, Vereyken EJ, Leenen PJ, van den Bosch TP, Rezaee F, Betjes MG, Baan CC, Rowshani AT. Human monocytes produce interferon-gamma upon stimulation with LPS. *Cytokine*. 2014.

Vereyken EJ*, **Kraaij MD***, Hilbrands LB, Leenen PJM, Hesselink DA, van den Bosch TPP, Baan CC, Betjes MGH, Rowshani AT. Monocytic profiles in kidney transplant recipients: stable grafts vs. rejection. *Manuscript submitted*.

* shared first author

Kraaij MD, van den Bosch TPP, Caliskan K, Balk AH, Leenen PJM, Betjes MGH, Baan CC, Rowshani AT. Peripheral blood monocyte subsets in heart transplant recipients. *Manuscript in preparation*.

