

University of Groningen

Mechanobiological aspects of (dysregulated) wound healing and the foreign body response

Wouters, Olaf

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:

2017

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

Citation for published version (APA):

Wouters, O. (2017). *Mechanobiological aspects of (dysregulated) wound healing and the foreign body response*. University of Groningen.

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

ABBREVIATIONS

CURRICULUM VITAE AND
LIST OF PUBLICATIONS

TISSUE ENG. COVER ART

DANKWOORD

NEDERLANDSE SAMENVATTING

MECHANOSENSING

Mechanosensing beschrijft de respons van cellen op mechanische stimuli. De wondhelingscellen (fibroblasten) in ons lichaam reageren sterk op mechanische stimuli, en toch wordt al jaren vrijwel alle experimenten uitgevoerd op polystyreen, een bepaald soort plastic met een stijfheid die ver boven het fysiologische bereikrange ligt. Tijdens gestoorde wondheling (fibrose) veranderen fibroblasten in myofibroblasten (myo = spier). Dit houdt in dat de fibroblast contraherende eigenschappen krijgt vanwege de expressie van cytoskelet eiwitten, zoals het α -gladde spier-actine. Tevens produceren myofibroblasten grote hoeveelheden gecrosslinked collagen, hetgeen aanleiding geeft tot een stijver weefsel, waardoor weer meer myofibroblasten ontstaan tijdens het fibrose proces (terugkoppelingreactie ofwel feedback loop).

Het doel van dit proefschrift was het ontwerpen van een nieuw in vitro kweekmodel waarbij cellen op fysiologische stijfheid en op verschillende extracellulaire matrix (ECM) eiwitten (= de eiwitten die normaal om cellen heen liggen) gekweekt kunnen worden. Dit model bestaat uit verschillende lagen. Voor de onderste laag is gebruik gemaakt van een organisch acrylaatpolymeer, waarbij de verhouding acrylamide en bisacrylamide de uiteindelijke stijfheid bepaald. De volgende laag bestaat uit L-DOPA, een stof welke de mossel een sterke aanhechting geeft aan organische en anorganische ondergronden. Deze stof is als 'lijm' gebruikt voor binding van de derde laag, de ECM-eiwitten. Deze methode is beschreven in hoofdstuk 2, waarbij er ook direct een vergelijking is gemaakt met het tot op heden gebruikte model (sulfo-SANPAH). Hieruit kwam duidelijk naar voren dat L-DOPA de ECM aanmerkelijk beter en heterogener aan de gels met verschillende stijfheid kan koppelen. Hierdoor vindt er geen convolutie plaats van ECM-dichtheid en stijfheid, waardoor beter het effect van stijfheid losstaand van andere factoren onderzocht kan worden.

MACROFAAG MECHANOSENSING

Macrofaag, bestaande uit de woorden macro (=groot) en faag (=eter) is een ontstekingscel betrokken bij het opruimen van dode resten van cellen en het klaren van micro-organismen en anorganische inerte deeltjes. Macrofagen zijn onderdeel van het aangeboren immuunsysteem en spelen o.a. tijdens wondheling een zeer belangrijke rol.

Bij wondheling zijn macrofagen het meest talrijk tijdens de chronische ontstekingsfase. De macrofaag helpt bij het opruimen en instrueert o.a. de fibroblast. Macrofagen kennen twee uitersten in een glijdende schaal: de M1 en de M2 macrofaag. De M1 of klassiek geactiveerde macrofaag is een pro-inflammatoire macrofaag: d.w.z. dat de M1 zorgt voor meer ontsteking. De M2 of alternatief geactiveerde macrofaag is een anti-inflammatoire macrofaag welke betrokken is bij weefsel herstel en homeostase. Het doel van hoofdstuk 3 was te kijken in hoeverre de polarisatie van humane macrofagen gereguleerd kan worden door stijfheid. Dit is belangrijk omdat er een strikte balans moet zijn tussen pro en anti-inflammatoire om een juiste wondheling te faciliteren.

In dit hoofdstuk zijn de gels gecoat met collageen type I, het meest voorkomende ECM type tijdens de wondhelingsrespons, en zijn humane monocytten tot macrofaag gestimuleerd met behulp van macrophage colony stimulating factor (M-CSF). Na 3 dagen M-CSF zijn de macrofagen verdeeld in 3 groepen: (1) M1, gestimuleerd met LPS en interferon gamma, (2) M2, gestimuleerde met interleukine 4 en 13 of (3) ongestimuleerde of naïeve macrofagen, gekweekt met alleen gecomplementeerd medium. Vooral de derde groep was in deze erg interessant, om te kijken of stijfheid aanzette tot een bepaald fenotype. De conclusie van dit hoofdstuk is dat stijfheid geen effect lijkt te hebben op macrofaag polarisatie; polarisatie capaciteit was even hoog onafhankelijk van de stijfheid en stijfheid an sich zette niet aan tot een bepaald genotype.

DE VREEMDLICHAAMSREACTIE

Als voorwerpen in het lichaam worden geplaatst, zorgt dit voor een zogenaamde vreemdlichaamsreactie. Tijdens deze vreemdlichaamsreactie ontstaat een ontstekingsreactie waarbij het lichaam niet-eigen materialen in het lichaam probeert af te sto-

ten. De macrofaag en de fibroblast spelen hierbij een hoofdrol. Macrofagen binden aan het oppervlak van het (bio)materiaal en proberen binnen te dringen en het materiaal te degraderen. Vaak zijn de materialen te groot voor macrofagen om te degraderen, wat leidt tot “gefrustreerde fagocytose”. Dit leidt uiteindelijk tot macrofaag fusie: een grote cel met vaak tientallen tot honderden kernen. In hoofdstuk 4 hebben wij gekeken naar het effect van stijfheid gecombineerd met een andere ECM-component, fibronectine, op macrofaag fusie. Fibronectine, en vooral de aminozuurvolgorde arginine-glycine-asparaginezuur (het tripeptide RGD) in fibronectine is beschreven als induceerder van macrofaag fusie. In dit hoofdstuk zagen wij een stijfheid en ECM-geïnduceerd effect op macrofaag fusie. Bijzonder gegeven was dat er geen verschil zat tussen onze resultaten ten aanzien van fusie en de beschreven fusie genen: geen van de genen kon gerelateerd worden aan het wel of niet optreden van fusie.

CD44

Om een verklaring te geven hoe stijfheid en fibronectine fusie kunnen faciliteren is in hoofdstuk 5 gekeken naar de CD44 / Small GTPase pathway. CD44 is een membraaneiwit dat gevonden wordt in vrijwel alle ontstekingscellen, inclusief macrofagen. CD44 is beschreven als een macrofaag fusie marker, waarbij het intracellulaire domein afsplitst, en zorgt voor activatie van zogenaamde Small GTPases; eiwitten die o.a. betrokken zijn bij cytoskelet modificaties. Het is bekend dat er cytoskelet modificaties plaatsvinden vlak voor en tijdens fusie. We hebben geen verschillen gevonden in CD44 expressie tussen “gewone” macrofagen en macrofagen die gefuseerd waren. Verder is er geen verschil geobserveerd in CD44 expressie tussen de verschillende stijfheden. Hierop hebben we gekeken naar genexpressie van CD44 en genen die (indirect) gereguleerd worden door CD44. Helaas waren er weinig verschillen te vinden in de genen die aangezet worden door activatie van CD44.

SPECTRINS

In dit hoofdstuk lag de focus op de wondhelingscellen, de fibroblasten. In hoofdstuk 6 is gekeken naar spectrins in fibroblasten, als mogelijke nieuwe mechanosensing eiwitten. Spectrins zijn ei-

witten bestaande uit 2 subunits: α - en β -spectrin. Deze langvormige, rekbare eiwitten binden enerzijds het actine cytoskelet en anderzijds de binnenzijde van het celmembraan. Spectrins zijn beschreven als eiwitten die betrokken zijn bij cel uitspreiding en migratie, en bij regulatie van Yes-associated protein (YAP). YAP is een goed bestudeerd mechanosensing eiwit betrokken bij celdeling en cel differentiatie. Hoewel er veel bekend is over de rol van spectrin in verschillende soorten cellen, is er nooit gekeken wat de rol is van deze eiwitten in fibroblasten. Daarom hebben we fibroblasten gekweekt op verschillende stijfheden, en hebben we gekeken naar een knockdown van beide genen. Tot onze verrassing had spectrin knockdown geen effect op wondheling, migratie en/of differentiatie van fibroblasten in myofibroblasten.

VITAMINE C

In dit hoofdstuk lag de focus op de wondhelingscellen, de fibroblasten. In hoofdstuk 7 is gekeken naar het effect van vitamine C op fibroblast functie, en differentiatie van fibroblasten in myofibroblasten. Vitamine C lijkt naast een (bekend) effect op collageen type I, ook een groot effect uit te oefenen op myofibroblast formatie. Dit gebeurde alleen als vitamine C gecombineerd werd met transforming growth factor β 1 (TGF β 1) stimulatie. Vitamine C op zichzelf leek geen effect te hebben op myofibroblast formatie.

ABBREVIATIONS

aSMA	Alpha smooth muscle actin
AA	Ascorbic acid
AFM	Atomic force microscopy
ANOVA	Analysis of variance
APS	Ammonium Persulfate
BSA	Bovine serum albumin
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1)
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3 (monocyte chemoattractant protein 1a)
CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7 (monocyte chemoattractant protein 3)
CD	Cluster of differentiation
CLEC10A	C-type lectin domain family 10 member A (MGL-1)
Col I	Collagen type I
Col1a1	Collagen type 1A1
DAPI	4;6-diamino-2-phenylindole
DC-SIGN	(Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (CD209)
DC-STAMP	Dendritic cell-specific transmembrane protein
ECM	Extracellular matrix
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FAK	Focal adhesion kinase
FBGC	Foreign body giant cell
FBR	Foreign body response
FBS	Fetal Bovine Serum
FN	Fibronectin
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid
HRP	Horse Radish Peroixdase
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
KD	Knockdown
kPa	Kilo Pascal
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine

LPS	Lipopolysaccharide
M1	Classically activated macrophages
M2	Alternatively activated macrophages
MEMa	Minimal essential medium a
MMPs	Metalloproteinases
MRC1	Mannose receptor, C type 1 (CD206)
PAAMs	Polyacrylamide hydrogels
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PDMS	Polydimethylsiloxane
Sulfo-SANPAH	Sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitro phenylamino)hexanoate
TGF β 1	Transforming Growth factor β 1
Vin	Vinculin
YWHAZ	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta

CURRICULUM VITAE

De auteur van dit proefschrift is geboren op 27 November 1987 in het Prinsengracht ziekenhuis te Amsterdam. De auteur is de jongste in de familie met één oudere broer (Axel) en twee oudere zussen (Fanny en Laura). Hij is getrouwd met Chantal Bosma en trotse vader van een drie-enéénhalf jarige dochter (Faylice) en een maand oude zoon (Finley).

De interesse en nieuwsgierigheid voor biologie zat er van jongs af aan in en deze nieuwsgierigheid werd mede gestimuleerd door zijn beide ouders, Harm en Loes Wouters. Verwondering voor de natuur speelde in zijn opvoeding een grote rol.

De auteur is na het basisonderwijs op het Da Vinci college in Purmerend terecht gekomen. Hier heeft hij zowel het VMBO als de HAVO doorlopen, met een focus op exacte vakken. Na de HAVO heeft hij zijn ingenieurstitel behaald op de Hanze Hogeschool te Groningen in Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek, met een specialisatie in research. Na het behalen van het HBO diploma is hij gestart met een overbruggingsprogramma aan de RUG, om zichzelf te kwalificeren voor de master Biomedical Sciences.

Na het behalen van het felbegeerde master diploma en de doctorandus titel is de auteur als PhD-student een promotie traject gestart bij TiGeR (Tissue Generation and Repair) onder leiding van Prof. dr. R.A. Bank. Later is deze naam veranderd in MATRIX (Matrix Accumulation, Tissue Regeneration and Inflammation). Deze groep focust zich op macrofagen en fibroblasten in het (gestoorde) wondhelingsproces. Bij deze groep kreeg de auteur de mogelijkheid zich zowel breed als in de diepte te ontwikkelen op het front tussen cel biologie en biomechanica, wat uiteindelijk geleidt heeft tot dit proefschrift.

Momenteel werkt de auteur als docent moleculaire biologie aan de opleiding waar hij 8 jaar geleden zelf afstudeerde: de Hanze Hogeschool te Groningen.

LIST OF PUBLICATIONS

PUBLISHED

3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine as a novel covalent linker of ECM to polyacrylamide hydrogels with a tunable stiffness.

Olaf Y. Wouters, Diana T.A. Ploeger, Sander M. van Putten, and Ruud A. Bank, Tissue Engineering part C: 2016 February; 22(2): 91:101.

Substrate elastic modulus regulates the morphology, focal adhesions, and alpha-smooth muscle actin expression of retinal muller cells.

Bu, S-C., Kuijjer, R., van der Worp, R. J., van Putten, S. M., Wouters, O., Li, X-R., Hooymans, J. M. M. & Los, L. I. 2015 In : Investigative ophthalmology & visual science. 56, 10, p. 5974-5982

SUBMITTED FOR PUBLICATION

Polarization of human macrophages into M1 and M2 phenotypes is stiffness independent

Olaf Y. Wouters, Diana T.A. Ploeger, Pytrick P.G. Jellema, Saskia de Rond, Ruud A. Bank

Fusion of macrophages: formation of foreign body giant cells is stiffness dependent, irrespective of IL4/IL13 stimulation.

Olaf Y. Wouters, Diana T.A. Ploeger, Saskia de Rond, Ruud A. Bank

all-spectrin and β II-spectrin do not affect fibroblast mechanosensing and TGF β 1-induced myofibroblast differentiation.

Olaf Y. Wouters, Bram Piersma, Ruud A. Bank

Ascorbic acid promotes a TGF β 1-induced myofibroblast phenotype Switch.

Bram Piersma, Olaf Y. Wouters, Saskia de Rond, Miriam Boersema, Rutger A.F. Gjaltema, Ruud Bank

DANKWOORD

Dit is het moment terug te kijken op 3 jaar, waarin in relatief korte tijd veel is gebeurd. Ik zou hierbij graag een aantal mensen willen bedanken voor hun directe of indirecte bijdrage aan dit proefschrift.

Ten eerste mijn promotor, Prof. dr. Ruud Bank.

Beste Ruud,

Vier jaar geleden gaf jij aan dat er een plek voor mij was binnen jullie groep, die toen nog Tissue Generation and Repair (Ti-GeR) heette. Ruud, bedankt voor de kansen die je me niet alleen toen, maar ook zeker gedurende het traject hebt geboden om mij verder te kunnen ontwikkelen. Niet alleen binnen het onderzoek, maar ook in het onderwijs, waar – achteraf terugkijkend – mijn hart ligt. Je hebt mij tijdens een aantal moeilijke jaren daar waar nodig goed ondersteund en aangestuurd binnen projecten. Ik heb ontzettend veel van je geleerd, vaak in combinatie met een goede dosis humor. Ik heb mijn passie en kennis voor onderwijs verder kunnen ontwikkelen met het behalen van verscheidene certificaten van gerenommeerde universiteiten met jouw steun. Daarnaast heb ik ieder jaar studenten mogen begeleiden tijdens de bachelor course Ontwikkelingsbiologie en Regenerative Medicine (OBRM), wat mij heeft geleerd studenten niet alleen op theoretisch maar ook op praktisch niveau te begeleiden. Bedankt voor alles!

Ten tweede wil ik mijn tweede promotor, Marco Harmsen bedanken. Marco, bedankt voor de kansen die jij mij hebt geboden om als 'onervaren' docent mee te draaien binnen jouw curriculum. Ik heb ontzettend genoten van het samen lesgeven en veel geleerd tijdens het 'flip-the-classroom' concept tijdens de master course Stem Cells and Regenerative Medicine. Jouw enthousiasme voor onderwijs is de start geweest voor mijn carrière als docent en zal mij altijd bijblijven. Daarnaast wil ik je graag bedanken voor alle gesprekken die wij nadien hebben gehad over mijn bewuste keuze om het onderwijs in te gaan.

De leden van de leescommissie, Prof. dr. Jenneke Klein Nulend,

Prof. dr. Jan-Luuk Hillebrands en Prof. dr. ir. Henk Busscher wil ik bedanken voor het lezen en goedkeuren van dit proefschrift.

Een dankwoord voor mijn vrouw en eerste paranimf, Chantal Wouters. Lieve Chantal, bedankt voor alle steun, liefde en geduld de afgelopen jaren. We hebben het vooral in het eerste levensjaar van onze dochter niet altijd gemakkelijk gehad, maar samen staan wij sterk. Ik ben ontzettend dankbaar voor jou en ons gezin, en zonder jou was dit proefschrift niet mogelijk geweest.

Een speciaal plekje in het dank woord is gereserveerd voor mijn tweede paranimf en collega, Diana Ploeger. Vanaf mijn tweede jaar hebben wij veel samengewerkt, aan zowel de DOPA paper als de macrofaag/giant cell stukken aangezien we beide geïnteresseerd waren in humane biologie van de macrofaag. Dit ging niet altijd van een leien dakje. Toch heeft het combineren van jouw macrofaag- en mijn biomechanica kennis ons veel gebracht. Hopelijk worden onze stukken (te lezen in hoofdstuk 3 en 4) snel geaccepteerd. Jouw (vaak enorme) opzet van experimenten, Groningse nuchterheid en gezelligheid blijven mij bij. En hoewel de vraag blijft of een optimist slechts een slecht geïnformeerde pessimist is of juist andersom, ben ik erg dankbaar voor de samenwerking die wij hebben gehad.

Ik wil mij graag richten tot mijn directe collega's, want het werk was niet hetzelfde geweest zonder jullie. Ten eerste de collega's die direct of indirect betrokken zijn geweest bij het tot stand komen van dit proefschrift.

Sander, in het eerste jaar heb jij mij op zowel theoretisch als praktisch vlak enorm veel geleerd, bedankt daarvoor. Daarnaast heb jij gefaciliteerd dat ik met de juiste mensen in gesprek kwam, waardoor ik onder andere low level compression testing (LLCT) en atomic force microscopy (AFM) heb geleerd bij de afdeling Biomedical Engineering. Dit heeft mij in staat gesteld de stijfheid van de polyacrylamide gels te meten wat aan de basis staat van tenminste 4 hoofdstukken. Daarnaast wil ik je uiteraard bedanken voor alles wat ik op andere vlakken van je geleerd heb, waar-

onder fluorescentie microscopie, de TISSUEFAXS en confocaal microscopie. De vele gezellig lunchpauzes, werkbesprekingen en onze reis naar Toronto (Canada) en Santa Fe (VS) zal ik niet snel vergeten! Daarnaast onze andere twee postdocs, Miriam Boersema en Marike van der Beuge, bedankt voor het delen van jullie kennis en de vele gesprekken die wij (vaak onder lunchtijd) hebben gehad.

Bram, in hoofdstuk 6 en 7 hebben wij samengewerkt aan twee papers. Ik wil je ten eerste bedanken voor alle feedback en sturing die jij aan deze projecten hebt gegeven. Daarnaast wil ik je bedanken voor alle gezelligheid. Je grappen (zoals lab-dances) zal ik niet snel vergeten!

Rutger, ik heb een ontzettende bewondering voor jouw doorzettingsvermogen en alle uren die jij in jouw promotietraject hebt gestoken. Het heeft je veel gebracht en ik hoop dat de kennis en ervaring die jij hebt opgedaan je nog veel verder zal brengen.

Daarnaast wil ik graag onze fantastische analisten, Pytrick en Saskia, bedanken voor alle steun die jullie geleverd hebben bij alle projecten. Zonder jullie was dit resultaat niet mogelijk geweest. Nataly, although I've only seen you in the first few months of your PhD we had some great laughs. De overige (oud)-matrix leden: Masum Mia, Evert Jan ten Dam, Jelena Popov en Jurjen Zandstra, bedankt voor alle gezelligheid. Jullie maakten TiGeR/MATRIX tot een gezellige groep!

Ik wil graag alle collega's van de Medische Biologie bedanken voor de gezelligheid en behulpzaamheid, met name Anita, Henriëtte, Jelleke, Linda, Henk, Theo, Peter, Marja, Wendy, Rianne, Guido, Janette, Hans, Ee Soo, Marousjka, Byambaa, Monika, Marloes, Genaro, David, Ditmer, Joris, José, Julio, Vincenzo, Ulke, Annet, Susan, Carolien en 'the face': Marcel.

Alle OBRM studenten: Ricky Wobbes & Rianne Haarsma (2014), Tom Schepers & Luca Molenaar (2015) en Richard Kommers & Kristan Otten (2016). Jullie hebben mij in laten zien dat naast

het vergaren van kennis een belangrijke rol is weggelegd in het delen van kennis, mede door jullie heb ik mijn pedagogische en didactische vaardigheden verder kunnen ontwikkelen en heeft het mij in laten zien dat mijn hart bij onderwijs ligt. Daarnaast wil ik graag Annika en Anna Wil bedanken voor de gezelligheid op het lab.

Een speciaal dankwoord gaat uit naar de afdeling Biomedical Engineering (BME), met name naar Joop de Vries. Joop bedankt voor alle (technische) ondersteuning bij het meten van de gels met de atomic force microscope.

Als laatste en voor mij het meest belangrijke: mijn dochter Fayette. Jouw stralende lach, onvoorwaardelijke liefde, onvermoeibare energie en positiviteit heeft mij enorm geholpen op de momenten dat het minder goed met mij ging. Je bent een schat en papa is ontzettend blij jou in zijn leven te hebben. Jouw pasgeboren broertje Finley maakt ons gezin nu compleet.

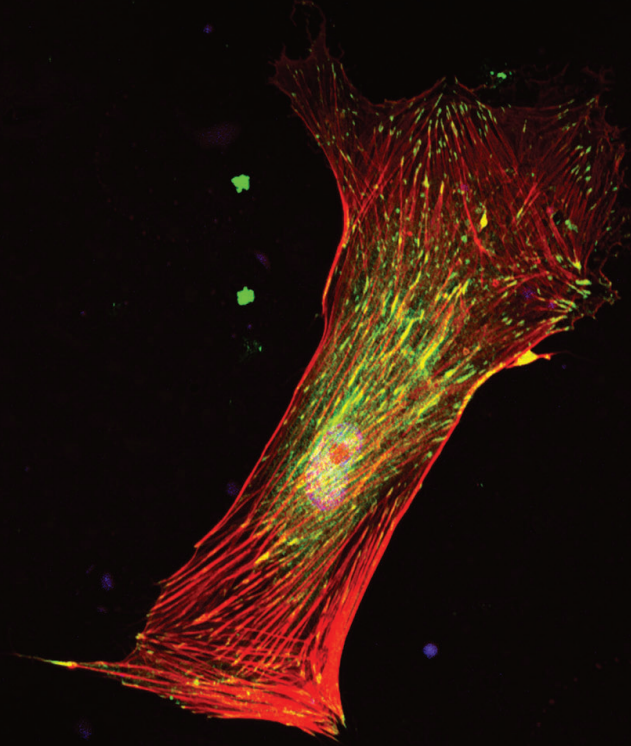
Olaf

ISSN 1937-3368

VOLUME 22 NUMBER 1
FEBRUARY 2016

Tissue Engineering

Part B: Reviews



9

APPENDICES

The Official Journal of
termis
Tissue Engineering
& Regenerative Medicine
International Society

Mary Ann Liebert, Inc.  publishers
www.liebertpub.com/teb

ISSN 1937-3384

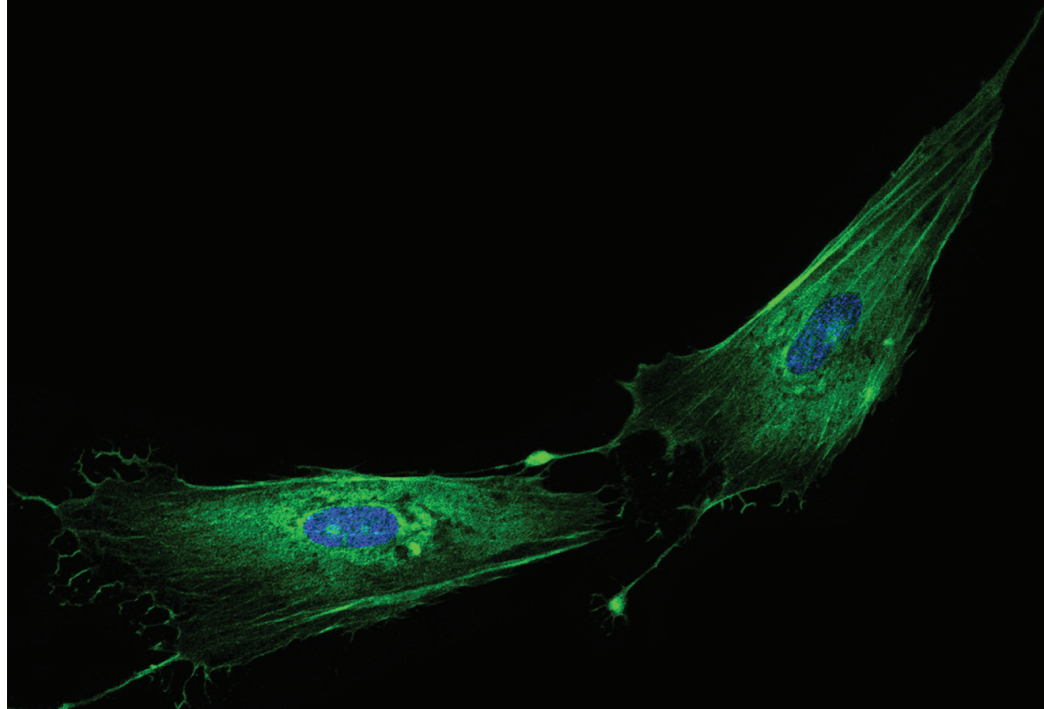
VOLUME 22 NUMBER 2
FEBRUARY 2016

Tissue Engineering

Part C: Methods

9

APPENDICES



The Official Journal of
termis[®]
Tissue Engineering
& Regenerative Medicine
International Society

Mary Ann Liebert, Inc.  publishers
www.liebertpub.com/tec