

The Development of Alveolar and Iron-Recycling Macrophages

Doctoral Thesis

Author(s):

Okreglicka, Katarzyna M.

Publication date:

2019

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000378398>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 26057

THE DEVELOPMENT OF ALVEOLAR AND IRON-RECYCLING MACROPHAGES

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

KATARZYNA MARIA OKRĘGLICKA

M.Sc., Jagiellonian University in Kraków

born on 05.04.1989

citizen of Poland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Manfred Kopf; examiner

Prof. Dr. Florent Ginhoux; co-examiner

Prof. Dr. Gerald Schwank; co-examiner

2019

2 Summary

Tissue resident macrophages are cells of the immune system which develop from fetal progenitors and are able to self-renew in adulthood with minimal contribution of monocytes. They are distributed throughout the body in order to provide immediate response to invading pathogens or danger. In addition, they perform important tissue-specific functions sustaining homeostasis. Tissue-specific development of macrophage subsets and their functions are determined by transcriptional programs that are induced locally by environmental cues. Recently, a few cytokines and metabolites produced specifically in certain tissues and the transcription factors induced in macrophages have been identified.

The transcription factors PPAR γ and Spi-C have been identified as main drivers of alveolar macrophage (AM) and red pulp macrophage (RPM) development, respectively. GM-CSF produced by alveolar epithelial cells induces PPAR γ in fetal lung monocytes, which drives development and function of AM by activation of many downstream target genes. Most of them are related to lipid metabolism and allow effective surfactant clearance, necessary for proper function of the lung. RPM are responsible for scavenging senescent red blood cells (RBCs) and iron-recycling. Heme, an intermediate product of hemoglobin degradation, indirectly activates Spi-C and animals lacking this transcription factor display strikingly decreased numbers of RPM and VCAM1⁺ bone marrow erythroid island macrophages (BMEIM). Similarly, characterization of macrophages in various tissues of conditional knockouts lacking *Pparg* in the hematopoietic cells revealed a requirement of *Pparg* for development of RPM and BMEIM, in addition to AM. Interestingly, while absence of *Pparg* abrogated RPM development already in neonates, analysis of *Spic*^{-/-} mice revealed that RPM were lacking in adults but not in neonates. Nonetheless, RPM present in neonatal *Spic*^{-/-} mice differed significantly from the wild-type (WT) controls at the transcriptome level. Expression of many genes related to iron metabolism was decreased, indicating that Spi-C controls RPM function but not development in neonates. Moreover, PPAR γ protein and mRNA expression were reduced in *Spic*-deficient RPM. Comparison of RPM transcriptomes from *Vav1-Cre/Pparg* ^{β/β} and WT mice provided insights on genes regulated by PPAR γ during RPM development. Despite strongly reduced numbers, remaining RPM from *Vav1-Cre/Pparg* ^{β/β} mice were able to phagocytose RBCs and had only slightly reduced expression of genes related to

iron metabolism. A small fraction of genes known as PPAR γ targets were down, while genes involved in migration and chemotaxis were up. Our study provided an evidence for a new role of PPAR γ during cell development, not connected to well-studied metabolic processes but rather to cell mobility and positioning of the progenitor in an environment supposedly providing survival and further signals allowing final differentiation steps.

Previous studies addressing tissue resident macrophage development and function relied on generation of M-CSF-derived bone marrow macrophages. However, considering the enormous heterogeneity of tissue resident macrophages, it is unclear how well these *in vitro*-generated cells recapitulate function and phenotype of *bona fide* tissue macrophages. More recent studies provided evidence of effective AM differentiation from bone marrow derived macrophages (BMM) or induced pluripotent stem cell-derived macrophages (iMac) upon transfer to AM-deficient mice (i.e. *Csf2ra*^{-/-} mice). Nonetheless, besides tissue-specific programming, the crucial influence of macrophage origin must be considered in order to produce the most relevant model for each tissue resident subset. We have established a protocol for efficient reconstitution of AM development in AM-deficient neonates by intranasal transfer of fetal monocytes. Specifically, we have isolated fetal liver or lung monocytes, the true AM progenitors, and optimized culture conditions allowing expansion and maintenance *in vitro* for several weeks. We noticed that cells expanded nicely in medium supplemented with GM-CSF and acquired AM-like phenotype within two weeks of culturing. After initial expansion, cells stopped proliferating but could be cultured for several months and maintained the capacity to reconstitute AM development upon transfer to AM-deficient recipients. The fetal monocyte-derived AM were able to prevent development of alveolar proteinosis and self-renew for at least one year after transfer. Moreover, cells could be transduced with retroviral vectors becoming a desired model to study AM function and development. Unfortunately, we have failed to establish CRISPR/Cas9-based gene editing in these cells. However, using another approach consisting of overexpression of HoxB4 in bone marrow cells (BMCs), we succeeded to establish long-lived and highly proliferative cells that have the capacity to differentiate to AM upon transfer to AM-deficient mice. Transient overexpression of Cas9 with guide RNA targeting GM-CSF receptor in HoxB4⁺ BMCs prevented the cell differentiation to AM following transfer, as expected. This proof of concept experiment assured us that this approach offers a good basis for a gene-screening platform identifying new genes involved in AM development and function.

Together, this study provides novel insight into RPM development and identifies new function of PPAR γ involving migration and cell retention rather than lipid metabolism. Moreover, it describes novel *in vitro* models for gene manipulation and editing in fetal monocytes and BMC-derived progenitors, which will allow future high-throughput screening for genes involved in AM differentiation and function.

3 Zusammenfassung

Gewebe-residente Makrophagen sind Zellen des Immunsystems, die sich aus fötalen Vorläufern entwickeln und sich im Erwachsenenalter mit minimalem Beitrag an Monozyten selbst erneuern können. Sie sind im ganzen Körper verteilt, um sofort auf eindringende Krankheitserreger oder Gefahren reagieren zu können. Darüber hinaus erfüllen sie wichtige gewebespezifische Funktionen, die die Homöostase aufrechterhalten. Die gewebespezifische Entwicklung von spezifischen Makrophagen und ihre Funktionen werden durch Transkriptionsprogramme bestimmt, die lokal durch Umwelteinflüsse induziert werden. Kürzlich konnten einige Cytokine und Metaboliten, die spezifisch in bestimmten Geweben produziert werden, sowie Transkriptionsfaktoren, die Makrophagen induzierten, identifiziert werden.

Die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und Spi-C wurden als Haupttreiber für die Entwicklung von Alveolarmakrophagen (AM) bzw. die Makrophagen der roten Pulpa (RPM) identifiziert. GM-CSF, das von alveolären Epithelzellen produziert wird, induziert PPAR γ in fötalen Lungenmonozyten, was die Entwicklung und Funktion von AM durch Aktivierung vieler nachgeschalteter Zielgene antreibt. Die meisten von ihnen stehen im Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel und ermöglichen eine wirksame Surfactant-Beseitigung, die für die ordnungsgemäße Funktion der Lunge erforderlich ist. RPM sind für das Abfangen alternder roter Blutkörperchen und das Eisenrecycling verantwortlich. Häm, ein Zwischenprodukt des Hämoglobinabbaus, aktiviert indirekt Spi-C, und Tiere, denen dieser Transkriptionsfaktor fehlt, zeigen eine auffallend reduzierte Zahl an RPM sowie eine reduzierte Zahl an einer Untergruppe von VCAM1⁺ Knochenmark-Erythroiden-Makrophagen (BMEIM). In ähnlicher Weise zeigte die Charakterisierung von Makrophagen in verschiedenen Geweben des bedingten Gen-Knockouts, denen *Pparg* in den hämatopoetischen Zellen fehlt, einen Bedarf an *Pparg* für die Entwicklung von RPM und BMEIM zusätzlich zu AM. Während das Fehlen von *Pparg* die RPM-Entwicklung bereits bei Neugeborenen verhindert, ergab die Analyse von *Spic*^{-/-} Mäusen interessanterweise, dass RPM bei Erwachsenen fehlten, nicht jedoch bei Neugeborenen. Nichtsdestotrotz unterschieden sich die in neonatalen *Spic*^{-/-} Mäusen vorhandenen RPM signifikant von den Wildtyp-Kontrollen auf Transkriptomebene. Die Expression vieler Gene, die mit dem Eisenstoffwechsel zusammenhängen, war verringert, was darauf hinweist, dass Spi-C die RPM-Funktion steuert, nicht aber deren Entwicklung in

Neugeborenen. Darüber hinaus waren die Expression von PPAR γ -Protein und mRNA in RPM mit Spi-C Mangel reduziert. Ein Vergleich von RPM-Transkriptomen aus *Vav1-Cre/Pparg β/β* und Wildtyp-Mäusen lieferte Einblicke in Gene, die während der RPM-Entwicklung durch PPAR γ reguliert wurden. Trotz stark reduzierter Zahlen konnten die verbleibenden RPM von *Vav1-Cre/Pparg β/β* -Mäusen rote Blutzellen phagozytieren und hatte nur eine geringfügig reduzierte Expression von Genen, die mit dem Eisenstoffwechsel zusammenhängen. Ein kleiner Teil von Genen, die als PPAR γ -Ziele bekannt sind waren reduziert, während Gene, die an Migration und Chemotaxis beteiligt sind, erhöht waren. Unsere Forschung lieferte einen Beweis für eine neue Rolle von PPAR γ während der Zellentwicklung, die nicht mit gut untersuchten Stoffwechselprozessen zusammenhängt, sondern eher mit Zellmobilität und der Positionierung der Vorläuferzellen in einer Umgebung, die angeblich Überleben- und weitere Signale bietet, die abschließende Differenzierungsschritte ermöglichen.

Frühere Studien, die sich mit der Entwicklung und Funktion von residenten Makrophagen beschäftigten, stützten sich auf die Generierung von mit M-CSF generierten Knochenmarkmakrophagen. Angesichts der enormen Heterogenität von gewebespezifischen Makrophagen ist es jedoch unklar, wie gut diese *in vitro* erzeugten Zellen die Funktion und den Phänotyp von bona-fiden Gewebemakrophagen widerspiegeln. Neuere Studien lieferten den Nachweis einer wirksamen AM-Differenzierung von aus Knochenmark stammenden Makrophagen (BMM) oder induzierten aus pluripotenten Stammzellen stammenden Makrophagen (iMac) bei der Übertragung auf AM-defiziente Mäuse (d. h. *Csf2ra*^{-/-} Mäuse). Abgesehen von der gewebespezifischen Programmierung muss jedoch der entscheidende Einfluss des Makrophagenursprungs berücksichtigt werden, um das relevanteste Modell für jede gewebespezifische Population zu erstellen. Wir haben ein Protokoll für die effiziente Rekonstitution der AM-Entwicklung bei dem AM-defizienten Neugeborenen, durch intranasalen Transfer fötaler Monozyten, entwickelt. Insbesondere haben wir fötale Leber- oder Lungenmonozyten isoliert, die echten AM-Vorläufer, sowie Kulturbedingungen optimiert, die eine Expansion und Erhaltung *in vitro* für mehrere Wochen ermöglichen. Wir haben festgestellt, dass sich die Zellen in mit GM-CSF angereichertem Medium gut ausdehnten und innerhalb von zwei Wochen nach der Kultivierung einen AM-ähnlichen Phänotyp erlangten. Nach der anfänglichen Expansion hörten die Zellen auf zu proliferieren, konnten jedoch für mehrere Monate kultiviert werden und behielten die Fähigkeit bei, die AM-Entwicklung

nach der Übertragung an AM-defiziente Empfänger wiederherzustellen. Die aus fötalen Monozyten abstammenden AM konnten die Entwicklung einer Alveolarproteinose verhindern und sich mindestens ein Jahr nach der Übertragung selbst erneuern. Darüber hinaus konnten Zellen mit retroviralen Vektoren transduziert werden, um sie zu einem gewünschten Modell für die Untersuchung der AM-Funktion und Entwicklung werden zu lassen. Leider konnten wir keine CRISPR/Cas9-basierte Genbearbeitung in diesen Zellen etablieren. Mit einem anderen Ansatz, der aus der Überexpression von HoxB4 in Knochenmarkzellen (BMCs) besteht, gelang es jedoch, langlebige und stark proliferative Zellen zu etablieren, die bei der Übertragung in AM-defiziente Mäuse die Fähigkeit haben, sich zu AM zu differenzieren. Eine vorübergehende Überexpression von Cas9 mit Führungs-RNA, die auf den GM-CSF-Rezeptor in HoxB4⁺ BMCs abzielt, verhinderte wie erwartet die Fähigkeit zur Differenzierung zu AM nach der Übertragung. Dieses Proof-of-Concept-Experiment hat uns versichert, dass dieser Ansatz eine gute Grundlage für eine Gen-Screening-Plattform bietet, die neue Gene identifiziert, die an der AM-Entwicklung und -Funktion beteiligt sind.

Zusammenfassend bietet diese Studie neue Einblicke in die RPM-Entwicklung und identifiziert neue Funktionen von PPAR γ , die Migration und Zellretention anstelle des Lipidmetabolismus einschließen. Darüber hinaus werden neue *In-vitro*-Modelle für die Genmanipulation und -bearbeitung in fötalen Monozyten und von BMC abgeleiteten Vorläufern beschrieben, die zukünftig High-throughput Screenings für Gene, die an der AM-Differenzierung und -Funktion beteiligt sind, ermöglichen.