

University of Groningen

Salivary gland stem cells

Nanduri, Lalitha

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:

2014

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

Citation for published version (APA):

Nanduri, L. (2014). *Salivary gland stem cells*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

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
Acknowledgements
Curriculum Vitae



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Tijdens de radiotherapeutische behandeling van hoofd- en hals kanker liggen de speekselklieren vaak onvermijdelijk in het bestralingsgebied. Hierdoor kunnen deze patiënten gaan lijden aan symptomen gerelateerd aan speekselklierdysfunctie. De straling geïnduceerde schade aan de speekselklieren is onomkeerbaar en blijft de rest van het leven bestaan. Tot op heden is er geen remedie gevonden om de door straling beschadigde speekselklieren te herstellen. Stamceltherapie zou een mogelijke optie kunnen zijn om deze patiënten te verlossen van slecht functionerende speekselklieren. Om een dergelijke behandeling mogelijk te maken moeten we echter eerst de speekselklierstamcel identificeren en karakteriseren. In dit proefschrift zijn de speekselklieren van knaagdieren gebruikt om speekselklier stamcellen te identificeren, technieken te ontwikkelen ter karakterisering en om hun potentie om schade aan de speekselklieren te voorkomen te bepalen.

Identificatie van mogelijke stamcellen van de speekselklier

In de meeste weefsel wordt de stamcel geïdentificeerd doordat deze relatief latent is, instaat is zichzelf te vernieuwen, alle cellen van het weefsel kan vormen en zich in een gespecialiseerde niche bevindt. Adulte stamcellen uniek voor elk weefsel kunnen met behulp van verschillende methoden gekarakteriseerd worden. In snel delend weefsel zoals huid en beenmerg kunnen de stamcellen worden herkend doordat ze in een toestand van rust of inactiviteit verkeren. Hierdoor kunnen ze DNA of membraan specifieke labels behouden die na/door celdeling in andere cellen verdunt worden of verloren gaan¹. In de muizen dunne darm zijn verschillende stamcellen gesuggereerd zijnde de $Igr5^+$ cellen in de bodem van de crypt en de zogenaamde positie cellen/ $BMI1^+$ cellen. Uiteindelijk bleken de $Igr5^+$ cellen de mitotisch actieve, Wnt gevoelige cellen dunne darm stamcellen te zijn terwijl $BMI1^+$ cellen de latente Wnt ongevoelige stamcellen te zijn, die ook nog resistent zijn tegen hoge doses straling. In ander weefsel zoals borstklier en prostaat weefsel werd gekozen voor een oppervlakte marker aanpak. Hierbij wordt een cel gelabeld met een antilichaam tegen eiwitten die specifiek op stamcel membranen tot expressie gebracht zouden worden. Aldus werden stamcel kandidaten gevonden die eiwitten CD24, CD29 en/of CD49f tot expressie brengen.

In dit proefschrift is gekozen voor een dergelijke oppervlakte marker aanpak om de stamcellen van de speekselklier van de muis te identificeren. In een voorgaande studie werd aangetoond dat speekselklier stam/voorloper (progenitor) cellen in culture sferen kunnen vormen

(primaire salisferen). In deze studie werd gesuggereerd dat uit salisferen afkomstige cellen die de c-Kit marker tot expressie brachten potentiële stamcellen zijn omdat ze instaat waren om speekselklieren deels te regenereren na stralingsschade.

In **Hoofdstuk 2** is verder gekeken of ander bekende klieren stamcelmarkers naast c-Kit zoals CD24, CD133 en CD49f⁺ tot expressie brengende cellen karakteristieken bezitten die wijzen op stamceleigenschappen.

In dit hoofdstuk wordt beschreven dat het kweken van speekselklier cellen in primaire sferen voor een verrijking zorgt van cellen die stamcel markers tot expressie brengen. In een poging om de meest potente stamcel te identificeren moeten potentiële stamcelmarkers, c-Kit⁺, CD24⁺/CD29⁺, CD133⁺ en CD49f⁺ tot expressie brengende cellen worden getest voor essentiële karakteristieken die stamcellen onderscheiden van gewone cellen. Het gebrek aan *in vitro* of *in vivo* methoden om de functionaliteit van mogelijke stamcellen te testen heeft echter het proces van identificatie van speekselklier stamcellen vertraagd. Daarom is eerst het eerder ontwikkelde *in vivo* model van straling geïnduceerde hyposalivatie geoptimaliseerd. In dit model worden lokaal de speekselklieren bestraald met 15Gy Röntgen stralen hetgeen een hyposalivatie induceert gelijkend op die van de patiënt. Een maand later worden groen fluorescerende eiwit (GFP) bevattende vermeende stamcel populatie getransplanteerd door injectie in de klier. Voor en op gezette tijden na bestraling wordt de speekselvloed gemeten als een maat van speekselklier functie. Verbetering in functie reflecteert weefsel regeneratie.

Aldus werden van primaire sferen afkomstige CD24⁺, CD133⁺, CD49f⁺ en CD24⁺/CD29⁺ marker tot expressie brengende cellen getransplanteerd in bestraalde muizen speekselklieren. De toename aan speekselvloed in muizen getransplanteerd met 10,000 CD24⁺/CD29⁺ cellen wees er op dat deze klieren beter functioneerden dan alleen bestraalde klieren of klieren van muizen die getransplanteerd waren met 10,000 CD133⁺ of 134,000 CD49f⁺ cellen. Gezien het feit dat 10,000 CD24⁺/CD29⁺ cellen in staat waren om straling geïnduceerd hyposalivatie in de muis te voorkomen suggereert de aanwezigheid van potente stamcellen in deze cel populatie. Het is echter onwaarschijnlijk dat de CD133⁺ en CD49f⁺ cel populaties in redelijke mate stamcellen bevatten aangezien vergelijkbare aantallen CD133⁺ cellen of hogere aantallen CD49f⁺ cellen onvoldoende herstel van speekselvloed gaven.

Stamcel transplantatie

Het primaire doel van stamcel transplantatie is het herstellen van de functie van beschadigd weefsel door het vormen van nieuwe gedifferentieerde/functionele cellen en/of cellen

die voldoende van deze cellen kunnen produceren voor een onbepaalde tijd. Handhaving van het aantal epitheliale cellen in gezond weefsel is echter mede afhankelijk van de aangrenzende endotheel cellen, bloedvaten, neuronale innervatie en de als gevolg daarvan toevoer aan nutriënten en groeifactoren nodig voor de communicatie tussen cellen. Straling beïnvloedt al deze factoren met als gevolg een verstoring van de homeostase en functionele achteruitgang van het weefsel. Het is dus belangrijk om de effecten van stamcellen transplantatie op weefsel homeostase te onderzoeken hetgeen gedaan is in **Hoofdstuk 3**. Eerdere onderzoek heeft aangetoond dat stamcel transplantatie in door straling beschadigd weefsel regeneratie induceert van functioneel acinair weefsel. Dit is eerst bevestigd na transplantatie van c-Kit⁺ of subpopulaties van c-Kit⁺ cellen waarbij waargenomen werd dat de functie van de bestraalde speekselklier in zekere mate hersteld was. Verdere analyse van de generale morfologie van de klieren liet zien dat nieuwe van de donor cellen afkomstige afvoerkanalen gevormd werden, met herstel van het aantal cellen die stamcellen tot expressie brengen, indicatief voor een in potentie herstelde weefsel homeostase. Tevens werd er interessant genoeg een vermindering in straling geïnduceerde fibrose (litteken vorming) en ontstekingsreactie waargenomen alsmede een genormaliseerd bloedvatstelsel, allen indicatief voor een gezonder weefsel structuur. Deze resultaten ondersteunen het feit dat stamcellen weefsel homeostase kunnen herstellen hetgeen nodig is voor een langdurig herstel en onderhoud van beschadigd weefsel. Op dit moment is het echter onduidelijk of de stamcellen hier alleen verantwoordelijk voor zijn of dat cytokines rijgemaakt door stamcellen of buurcellen een endogene stimulatie geven van homeostase regulerende signaal routes. Preliminair resultaten lijken te wijzen op het laatste.

Tot hier toe hebben we kunnen aantonen dat mogelijk stamcel kandidaten getest kunnen worden met behulp van een straling geïndiceerde hyposalivatie muizen model (Hoofdstuk 2) en dat het getransplanteerde weefsel geanalyseerd kan worden om de mate van herstel te beoordelen (Hoofdstuk 3). Hiervoor zijn echter grote hoeveelheden proefdieren voor nodig en het kost veel tijd. Kortdurende *in vitro* assays die een groot aantal condities kunnen screenen zou zeer bevorderlijk zijn om de identificatie van de speekselklier stamcel te versnellen, alsmede om stamcel eigenschappen zoals zelfvernieuwing en differentiatie en mogelijk ook expansie te bestuderen.

***In vitro* methoden om stamcel kandidaten te screenen**

De gouden standaard voor de identificatie van stamcellen binnen de stamcelbiologie is het aantonen van de *in vivo* regeneratieve/reparatie potentie. Maar zoals al boven genoemd

heeft dit zijn beperkingen. Daarom hebben we in dit proefschrift beschreven hoe we een korte termijn *in vitro* assay hebben ontworpen waarbij we kwantitatieve informatie van een te testen cel populatie kunnen verkrijgen die we kunnen screenen voordat we verder gaan met *in vivo* experimenten. Op deze manier verkrijgen we niet alleen meer informatie maar reduceren we ook het aantal te gebruiken proefdieren waarbij we de ethiek van dierexperimenten tevredenstellen.

In **Hoofdstuk 4** wordt zelf-vernieuwing en differentiatie van vermeende stamcellen aangetoond met *in vitro* assays. Allereerst worden enkelvoudige cellen uit primaire sferen geïsoleerd en uitgezaaid in een op matrigel gebaseerde matrix. Dit maakt het mogelijk om op het niveau van een enkele cel zelf-vernieuwing potentie gemeten als het in staat zijn om een secundaire sfeer te maken vast te stellen. Onze resultaten tonen aan dat CD24⁺ en CD49f⁺ cellen in grotere mate in staat zijn om secundaire sferen te vormen, vergeleken met ongefractioneerde, CD133⁺ of c-Kit⁺ cellen. Hierna werden secundaire sferen weer in enkelvoudige cellen verdeelt en opnieuw uitgezaaid om tertiaire, quataire etc. sferen te vormen. Deze procedure stel ons in staat om de sfeer vormende vermogen te kwantificeren en hierop cellen te selecteren. Met deze assay kunnen we c-Kit⁺, CD24⁺, CD133⁺ en CD49f⁺ cellen in zelfvernieuwing condities doorzetten voor meer dan 5 passages. De CD24⁺ en CD49f⁺ cellen laten een beter sfeervormende potentie zien hetgeen suggereert dat deze cel populaties beter in staat zijn om stam/voorloper (progenitor) cellen zichzelf te laten vernieuwen. Verdere testen van de differentiatie potentie van deze cellen zou ze beter kunnen karakteriseren.

Om een beschadigd weefsel te kunnen onderhouden en herstellen moeten stamcellen in staat zijn cellen te produceren die in alle verschillende types cellen van het weefsel kunnen differentiëren. Om deze eigenschappen te onderzoeken werden uit een enkele cel afkomstige secundaire sferen onder differentiatie inducerende condities *in vitro* gekweekt. Om deze methode te ontwikkelen was er nogal wat optimalisatie nodig, maar uiteindelijk zijn we in staat gebleken om structuren te laten groeien die duidelijk de uiterlijke kenmerken vertoonden van speekselklieren. We hebben laten zien dat sferen een enorme morfologisch verandering kunnen ondergaan van een afgeronde vorm naar een 3-dimensionale structuur gelijkend op het weefsel (organoiden of mini-klieren) bestaande uit uitgestrekte ductale verlengingen (ductale organoiden) en compacte lobulaire structuren (lobulaire organoiden). Vervolgens hebben we met confocale microscopie, immuno-histochemie en gene-expressie profielen kunnen aantonen dat er inderdaad diverse soorten gedifferentieerde speekselkliercellen in de organoiden aanwezig waren. Van de geteste stamcel kandidaten bleken, ongefractioneerde en CD24⁺ cellen relatief veel organoiden

te vormen hetgeen suggereert dat deze populatie stam/progenitor cellen bevatten die in staat zijn om te differentiëren in alle verschillende celtypes van de speekselklier. Deze celtypes zijn dan ook kandidaten om *in vivo* getest te worden of ze in staat zijn om een beschadigde klierfunctie te herstellen.

In Hoofdstuk 2 wordt aangetoond dat c-Kit⁺ en CD133⁺ cellen in staat waren om de *in vivo* functie van door straling beschadigde te herstellen, terwijl CD24⁺ cellen alleen een significante verbetering lieten zien als ze werden geselecteerd in combinatie met CD29⁺ cellen, terwijl CD49f⁺ cellen geen herstel konden induceren. Met deze kandidaat stamcellen werd getest of dezelfde effecten waargenomen konden worden in onze nieuw ontwikkelde *in vitro* assay. Deze experimenten lieten zien dat CD49f⁺ cellen ondanks dat ze wel instaat zijn zichzelf in enige mate te vernieuwen geen significante differentiatie lieten zien (Fig.6, Hoofdstuk 4), hetgeen overeen komt met het gebrek aan *in vivo* gevonden effecten (Fig.4, Hoofdstuk 2). Bovendien, bleken CD24⁺ cellen wel instaat zichzelf te vernieuwen en te differentiëren, beide karakteristieken van stamcellen (Fig.6, Hoofdstuk 4), wat overeenkomt met de *in vivo* data die een significant herstel lieten zijn indien de selectie met CD29 gecombineerd werd. (Fig.4, Hoofdstuk 2). Deze resultaten suggereren dat, de in dit hoofdstuk beschreven *in vitro* assays de stamcellen activiteit van individuele cellen kunnen bepalen als hun vermogen om te zichzelf te vernieuwen en differentiëren. Dit kan helpen om de potentiële speekselklier stamcellen beter te begrijpen en te karakteriseren.

Kortom, de in dit proefschrift beschreven assays kunnen niet alleen zorgen voor een snelle, betrouwbare screeningsmethode van stamcel kandidaten voor transplantatie, maar kunnen ook leiden tot bredere toepassingen (zie future perspectives) om meer inzicht te krijgen in de mechanismen verantwoordelijk voor speekselkliercellen “stemness” en differentiatie zoals vertakking morfogenese. De ontwikkeling van deze relatief snelle *in vitro* bepalingen kan aldus worden beschouwd als een doorbraak op het gebied speekselklier stamcelbiologie.

Expansie van volwassen stam/voorlopercellen

Aangezien CD24 geïdentificeerd is als potentiële stamcel marker in Hoofdstuk 4, werd deze gebruikt, in analogie met de borstklier, in combinatie met expressie van CD29 om te zoeken naar nog potentere populaties. Hoewel CD24/CD29 positieve cellen stamcel-achtige cellen lijken te bevatten (Hoofdstuk 2), is het onwaarschijnlijk dat al deze cellen speekselklier stamcellen zijn, en lijkt verrijking van deze populatie mogelijk. Met behulp flowcytometrische analyse konden we vier subgroepen binnen CD24/CD29 cel populatie onderscheiden, nameli-

jk CD24^{hi}/CD29^{lo}, CD24^{hi}/CD29^{hi}, CD24^{med}/CD29^{hi} en CD24^{hi}/CD29^{lo} subpopulaties. Deze subgroepen zijn niet zo gemakkelijk te onderscheiden als die gevonden in borstklierweefsel, daarom werd een arbitraire selectie-strategie gebruikt om afzonderlijke subsets van deze cellen te isoleren. Eenmaal geïsoleerd als enkele cellen, werden de vier subgroepen getest op hun zelf-vernieuwing en differentiatie potentieel met behulp van de in hoofdstuk 4 beschreven *in vitro* assays (**Hoofdstuk 5**). De resultaten toonden aan dat CD24^{hi}/CD29^{hi} cellen een aanzienlijk hoger secundair-sfeer vormend vermogen hadden en in staat waren om zichzelf voor meer dan 5-passages konden vernieuwen. Dit terwijl CD24^{med}/CD29^{hi} cellen niet voor meer dan 4 -passages konden worden gehandhaafd. Interessant genoeg konden CD24^{med}/CD29^{hi} cellen alleen ductaal organoids vormen, terwijl CD24^{hi}/CD29^{hi} cellen zowel ductale als lobulaire organoids konden vormen en dus een multi-differentiatie potentieel hebben. Deze resultaten laten zien dat de CD24^{hi}/CD29^{hi} cel populatie waarschijnlijk de meest potente stamcellen bevatten die in staat zijn tot *in vitro* zelfvernieuwing en differentiatie.

De beperkte beschikbaarheid van en het zeer lage aantal potentiële stamcellen die kunnen worden verkregen uit patiënt-biopsie materiaal remt de vooruitgang in het onderzoek naar menselijke speekselklier stamcellen. Daarom is het van eminent belang om strategieën te ontwikkelen om van patiënt-biopsie afgeleide cellen te kunnen expanderen, zodat er voldoende cellen van hoge kwaliteit beschikbaar komen voor wetenschappelijk onderzoek en voor autologe stamceltransplantatie ter behandeling van patiënten. Echter, expansie van functionele adulte stamcellen is een van de grootste uitdagingen op het gebied van volwassen stamcellen biologie.

Vandaar dat we in dit proefschrift hebben we getest of de CD24^{hi}/CD29^{hi} cel populatie zou kunnen worden geëxpandeerd en belangrijker nog functioneel zou dergelijke na expansie. Het kweken van primaire-sferen afgeleide CD24^{hi}/CD29^{hi} cellen voor meer dan 7-passages werd een zeer aanzienlijke expansie van cel aantallen waargenomen zeker in vergelijking met niet-geselecteerde cellen (Hoofdstuk 5). Tevens bleek dat de geëxpandeerde cellen wanneer getransplanteerd in door straling beschadigde speekselklieren, in staat waren om de verminderde speekselvloed op zeer consequente manier aanzienlijk te verbeteren. Dit effect bleek beter dan dat wat voor elk ander celttype getest met dezelfde cellulaire dosis tot dusver gevonden was. Muizen getransplanteerd met late passage (passage-13) cellen vertoonde een verbeterde en meer homogeen herstel van de speekselproductie, dan met vroege passage cellen (passage-2) getransplanteerd dieren. Dit geeft aan dat seriële passage van CD24^{hi}/CD29^{hi} cellen niet alleen meer sfeer vormende cellen bevatten, maar ook verrijkt zijn in functionele stamcellen die bestraalde

speekselklieren kunnen reconstrueren.

Om de signaal routes die betrokken zijn bij de verrijking van stamcellen in cultuur te begrijpen, werd een genoom brede genexpressie analyse van deze cellen uitgevoerd. De hieruit verkregen resultaten suggereren dat mogelijke Wnt- en Hedgehog signaal routes een rol spelen, welke in verband worden gebracht met de regulering van stamcellen van andere volwassen weefsels. Echter, elk gen dat betrokken zou kunnen zijn moeten opnieuw worden getest op hun regulerende werking in het proces van stamcel expansie en verrijking (zie Future perspectives). Bevestiging van de betrokkenheid in het proces van zelf-vernieuwing en expansie van deze routes kan leiden tot mogelijkheden om deze te manipuleren en zou dus nuttig kunnen zijn voor de ontwikkeling van een klinische toepassing.

Wijze van stamceltransplantatie

Om belangrijke aspecten van klinische transplantatie te onderzoeken werd er een groter diermodel ontwikkeld, die de haalbaarheid van stamcel transplantatie en een potentieel betere en gemakkelijker levering van stamcellen aan de patiënten zou kunnen aantonen. Het voordeel van een ratten model is dat we net zoals bij mensen een toegang hebben tot zowel glandula parotis als de glandula submandibularis. Hierdoor kunnen we de methode van retrograde ductale injectie van stamcellen testen hetgeen een potentieel klinisch interessante manier zou kunnen zijn voor de behandeling van patiënten.

Eerst moesten de stam/progenitor cellen van de speekselklieren van ratten geïsoleerd worden. Alhoewel muizen primaire sferen met succes kan worden gebruikt om van de ratten glandula submandibularis sferen te verkrijgen, is het wellicht niet geschikt voor het kweken van glandula parotis cellen van ratten. In **Hoofdstuk 6** werd het kweekmedium geoptimaliseerd en aldus konden primaire salisferen van zowel de ratten parotis als submandibularis klieren verkregen worden. Daarnaast werd aangetoond dat zowel de parotis en submandibularis klier primaire salisferen cellen bevatten die in staat zijn om zelf-vernieuwing en te differentiëren. Verder hebben we middels immuno-histochemie en flow cytometrie getest of er cellen aanwezig waren die stamcel markers tot expressie brengen. De resultaten toonden aan dat, vergelijkbaar met de verkregen resultaten uit ons muis model, CD24, CD133 en c-Kit stamcel markers tot expressie worden gebracht in rat speekselklier duct cellen en dat deze cellen verrijkt zijn in de gekweekte salisferen.

We weten van ons muismodel dat transplantatie van stamcellen door directe injectie het

slechtere functioneren van de klieren kan verminderen. Dit betekent echter niet dat dit in alle situaties tot een uniforme distributie en juist lokalisatie van cellen in de getransplanteerde muis leidt. Bij patiënten, is een intra-glandulaire transplantatie middels random injectie niet ideaal vanwege de complexiteit van de klier en de noodzakelijke te volgen chirurgische procedure. Echter, parotis en submandibularis klier afvoerkanalen komen rechtstreeks uit in de mondholte in de wang en onder de tong. Deze zijn eenvoudig bereikbaar door de mond. Aangezien deze afvoerkanalen mogelijk de niche voor de stamcellen zijn, werd er getest of retrograde aflevering van stamcellen in de afvoerkanalen een efficiënte transplantatie methode zou kunnen zijn.

Aldus werden van primaire-salisferen afkomstige ongeselecteerde of c-kit tot expressie brengende cellen retrograad getransplanteerd in de lokaal bestraalde submandibularis en parotis klieren van ratten. Deze experimenten zijn nog niet afgelopen maar voorlopige resultaten laten enig herstel van speekselklier functie zien die echter niet hetzelfde is wanneer er vergeleken wordt met directe intra-glandulaire injecties. Daarom ondersteunen onze bevindingen op dit moment niet een mogelijke retrograde injectie van cellen als een superieur transplantatie methode. Alternatieve werkwijzen voor transplantatie zullen dus gezocht moeten worden, zoals bijvoorbeeld echo geleide injectie van cellen in de afvoerkanalen. Dit zal echter getest moeten worden in grotere diemodel.

De in dit proefschrift beschreven bevindingen bereiden weg voor een snelle massale screening van stamcel kandidaten voor eigenschappen als zelfvernieuwing capaciteit, differentiatie en expansie potentieel. Vervolgens kunnen betrokken genen, en signaalroutes bepaald worden waardoor een mogelijke snelle detectie en manipulatie van humane stamcellen mogelijk zou moeten zijn.

De kennis verkregen door mijn promotie onderzoek en beschreven in dit proefschrift kunnen vervolgens gebruikt worden voor het testen van isolatie, preservatie en transplantatie van humane speekselklier cellen. Hopelijk zal in de zeer nabije toekomst leiden tot een fase-I klinische studie ter voorkoming van straling geïnduceerde xerostomie, welke mogelijk resulteert in een verbetering van de kwaliteit van leven. Vooralsnog zal deze methode alleen toepasbaar zijn als autologe transplantatie voor patiënten met een risico op straling geïnduceerde hyposalivatie, maar wellicht kan er in de toekomst gedacht worden aan een allogene transplantatie bij patiënten die lijden aan andere speekselklier ziekten veroorzaakt door bijvoorbeeld auto-immuunziekte zoals syndroom van Sjögren en na veroudering.

ACKNOWLEDGEMENTS

The very idea of writing “acknowledgements” helped me to take a moment to recall how my supervisors/colleagues/friends contributed to my memorable PhD journey. It is because of all these wonderful people I never realised that this journey started four long years ago.

First and foremost, I extend my deepest gratitude to my supervisor **Rob** (Prof. Robert P Coppes) who believed in me and made my dream of PhD a reality. *Beste Rob!* without your inspirational guidance, honest encouragement, constructive criticism, this could not have been possible, *Hartelijk bedankt!* You taught me scientific writing, being critical at our own work, to think always “why I want to do this?” (highly repeated question in our PhD meetings); the last part will guide me for all my life independent of my scientific career. I always enjoyed bringing you to the microscope to show exciting things our cells can do. Especially your enthusiasm towards science kept me motivated whenever my experiments disappointed me. Best part is, despite your busy schedule you always made time for me whenever I needed a discussion. On a personal note, your fatherly affection to make sure I am ok during troublesome period was remarkable, thanks is just not enough. Over all I am here today converting our efforts into this nice book, which I am happy with. On a special note, thanks to Monique and your kids for the kind hospitality and nice get-togethers at your place. I wish you all the best for the future and hope to see more striking breakthroughs in this project.

Beste Ronald (Dr. Ronald van Os)! your kindness, wittiness cooled the heat during PhD meetings, which brought a perfect balance I feel ☺. Your way of asking lot of short questions, to bring out answers from me, expanded my perspective towards the project. I had lots of fun with you testing my Dutch skills ☺ (you did too I guess!), long conversations on writing-dead-lines-thesis-paper-what not! Big-big thanks to you for being very positive always and encouraging-acknowledging some best moments of my PhD. I wish you all success with future career and cheers to Judith.

Beste Gerald (Prof. Gerald de Haan)! Thank you very much for your encouragement, and appreciation from the first DSSCR meeting till the last. Your continuous support in the project and towards my future career is unforgettable, especially my involvement with Miltenyi. I wish you keep on encouraging lots and lots of young aspirants into science!

Special thanks to **Rob** and **Gerald** for the very detailed dutch summary that is a part of this thesis.

I would like to thank the honorable reading committee members of this thesis, **Prof. Charles L. Limoli, Prof. Marc Vooijs** and **Prof. Arjan Vissink** for your time and effort in the evaluation of my thesis and your valuable suggestions.

My deep gratitude to **Prof. Geetha, Dr. Raghuram** and **Prof. Singaracharya** for continuous support and concern with your encouraging e-mails during my study.

Sincere thanks to our graduate school **GUIDE** for the financial support all through my PhD that helped me to attend exciting international/national meetings and workshops.

Life in lab was memorable because of some amazing people. *Beste* **Marianne!** Thanks for introducing me to salivary glands and showing me around in my first month here. I enjoyed my first sorting-transplantations with you, and shared fun & frustration post-sorting ☺ with tricky cell numbers! Your pleasant smile, and friendly nature not only made life in lab pleasant but helped me to forget my stress when I spoke to you ☺. Be the same wonderful person ☺!

In my last two years I had amazing helping hands from Mirjam. *Beste* **Mirjam!** Though there was lag phase for us at first, I am very glad that in couple of months we have become a very good team ☺. I appreciate your efforts with *in vitro* work when I was overloaded with animal experiments and was fun with all the brain storms with plans A,B,C.. that generated exciting data (Chapters 4,5 this thesis). I always enjoyed our meetings in your office with Marianne, Hette, Jeanette jumping in ☺. Thanks for being very understanding during the PhD meetings and most importantly during stressful last months. I think you agree that having trust and confidence in your team member will make science fun and more productive at the end. Thanks for happily agreeing to be my Paranymp and supporting me all through ☺, wish you success with future.

Beste **Hette!** It was quite a journey with rat project for you, me and Mirjam. I enjoyed long days of saliva measurements with you and got to know more about you, Teikla and your loving cat ☺. Thanks for teaching me some “Dutch words” during injections ☺. Specially your liking for indian food is remarkable! I can’t forget moments when you said “perfect” for my technical skills ☺. I wish you have great fun with our newly arranged histology lab.

Wonderful friends made my life outside lab memorable. *Beste* **Sonja!** I have no words to describe the friendship we shared, except to say it is *gezellig!* You have been a loving, caring, affectionate friend. I cannot forget the amazing trip to Madurodam, ladies night at Pathe, I missed it all so much! Thanks to you my dear for being my Paranymp ☺ and supporting me all through. Cheers to **Rik** for understanding us and wish you both great future together.

My dear **Ghazale!** Thanks for being such a great loving friend. Your positive attitude,

kindness and amazing energy is simply so cool! I missed you so much after you moved to Amsterdam. I will always cherish your nice company and great food. Cheers to **Emad** for being a kind friend too ☺. Wish you both happy life ahead with big boy Arwin ☺.

Beste Paul! Thanks for being very kind and humble friend ☺ I miss your *chocoladetaart* with the coffee breaks we had and your amazing kitchen is unforgettable ☺. Wish you all the best in Norway!

Becoming good friend does not take ages, sometimes it happens in a very short time. *Beste Nynke!* I am so glad you joined our group in my last year which made us good friends. You have been such a great comfort during tough times and very understanding. Thanks to my dear brother **Jurjan** for being so supportive and becoming a great friend too ☺. I will cherish happy time we had during coffee breaks and get-togethers ☺. I strongly hope we continue this friendship and good luck to you both!

Dear Pringles (**Sarah**)! You brought so much of energy to the group, especially to our office (I was almost alone in that room), you were strong support always & thanks for teaching me some “magical words” (you know huh ☺) that helped me a lot!! I had so much fun in the trip to Niagara falls with you!. Dear **Martti**, thanks for all the productive scientific discussions. You got amazing curiosity ☺ in everything, especially in India. Dear **Peter**, thanks for being a very humble, kind friend. Enjoy counting foci ☺. Missed you guys! Good luck to you all and hope you guys are keeping the cookie-jar alive ☺

Beste Reinier! Your curiosity towards science and your enthusiasm to tease me is amazing and cheers to the long-long-long-long-long conversations about the project. It was lot of fun ☺. *Beste Djoke!* Its great fun working in the tissue culture with you and Reinier ☺. I always appreciate your enthusiasm and keen observation in doing experiments and all the fruitful and fun conversations we had, specially your kind and concerned emails ☺. Dear **Cecilia**, really nice to know you in the very short time that we worked together. Dear **Daisy** thanks for nice gestures with chocolates. Good luck to all of you.

Beste Peter (Dr. Peter van Luijk) and **Monique** (Dr. Monique Stokman)! Thanks for the nice discussions and your valuable input during work in progress meetings. Dear **Roland** (Dr. Roland Chiu)! It is always energetic when you are around, and thanks for the valuable discussions on science and English ☺. Success to you all!

Thanks to **Anil** for patiently replying to my queries about moving to Groningen and showing me around in lab ☺. *Thambi Balaji!* When I had early morning experiments (most of

the times) you always welcomed me due to your late night experiments in lab ☺ not forgetting the sudden scary crossover in elevators ☺. *Romba nandri unga kuda pesi yennoda tamizh nalla improve ayyidichi (appidi da naan ninaikiren ☺)*. Hello ji **Vaishali**, *bahut Khushi hein, PhD ke wajah se hum dosth bane*. You have been a very strong support always, a friend for life. Hope one day we go home and start our fruitful collaboration like you, me and Bala always talked!

Beste Annet! Thanks for helping me a lot with Dutch letters and always greeting with a great smile ☺. *Beste Jeanette* you were supportive with lot of logistics and always very kind, we shared nice laughter and chocolates at your office, that was *gezellig!* Thanks **Bart** for the fun during lab-days, especially for giving me “blue tips-filling task” all four years, trust me it was a great stress-buster. I enjoyed it a lot!!! Thanks **Maria** for being very kind to me. *Hartelijk bedankt allemaal ☺*

Special thanks to **Harrie** (Prof. Harrie Kampinga), **Ody** (Prof. Ody Sibon), **Dick** (Prof. Dick Hoekstra), **Ben** (Prof. Ben Giepmans), **Sven** (Prof. Sven van IJzendoorn) and other members of DCB for the encouragement and fruitful discussions during the meetings to improve science. Thanks to **Klaas** for helping me with imaging, and **Jeroen** for the collaboration and knowledge about electron microscopy. Big thanks to you **Gerry**, for all the great help with paper work and you always amazed me by remembering so many details of PhD students from many projects!

Thanks to **Melania**, **Melanie**, **Despina**, **Nicola**, **Madina**, **Jan**, **Lisa**, **Yixian**, **Wondy**, **Matteo**, **Steven**, **Pascale**, **Onno**, **Cecile** for making life in lab and lab-days fun and memorable.

Heartfelt thanks to **Martha** for being very humble, kind friend ☺. Always fun to spend time with you **Martha**, **Evgenia**, **Edyta**, **Sara**, **Karin**, **Ellen**, **Bertein**, **Mathilde** in the lab and during meetings ☺. Dear **Visjnuska!** It was always fun to meet you (often?) at gym ☺ and share some good laughter. Special thanks to you **Leonid**, for your valuable suggestions on the project in general and especially your support with micro array analysis. *Beste Erik!* thanks for being very kind and helping me with numbers ☺ (statistics), and your continuous support until submission also during your holidays. It was lot of fun working with you on numbers and I appreciate your patience with my questions ☺.

Thanks to **Henk**, **Geert**, **Roelof-Jan** from the flow cytometry facility for the knowledge and great help with sorting and a very nice company during sorting ☺.

Most of my time was spent in Animal facility (CDP), where I had very understanding, and valuable guidance from **Catriene** and **Miriam**; friendly support from **Micheal**, **Annemieke**, **Andre**; funny Dutch conversation with **Ramon**; help with animals in my absence from **Sander**,

Maurice, Natasha, Yvonne; administrative support from **Alex, Arie, Wiebe, Sylvia, Juul**; logistics made easy because of **Hester, Linda, Minke!** *Bedankt allemaal* ☺.

Great company of many Indian friends made stay in Groningen memorable. First and foremost thanks to **Sirisha-Raj** for helping me settle and adjust being away from home. Thanks to **Kalyani-Ratna, Vaishali-Pranav, Sangeeta-Hans, Samta-Iljea** (very sweet parents of Samta), **Aneesh, Sumitha-Guru, Kiran, Soni, Meenu-Pranav, Sphoorti-Akshay, Ananya-Shiva, Gopi Y, Shubha-Ganesh, Raja, Rajender, Pranov, Suresh** for the fun and memorable get-togethers. Thanks to you **Shiva, Aditya, Ashoka** for the encouragement and fun filled evenings with tea and food ☺. Thanks my dear **Saritha** and **Anna**, for the unforgettable conversations and being very understanding always, good luck to you both. Dear **Gaurav**, great to have you as neighbor for four years, living in student house was fun with you and **Subir**. Thanks to all the GISA and DGW members for being cooperative in organizing events and making sure we did not miss festivals and cultural activities ☺. Thanks to **Kamakshi-Kaushik, Krithika-Sankaran, Sowmya-Thiru** for the fun filled holidays and great food ☺.

Groningen became my second home, the moment I found my friends who became my family. My dear **Fiaz, Sasanka, Tauqeer** – you have been there for me, and I know you will be there for me always. Though we started as a bachelor group, was very happy when **Divya, Rahela, Zainab** joined who brought colors to the group. Love you all and thanks for the happy, fun filled days we spent in Groningen. Best wishes for the successful and happy life ahead for us all ☺ miss you!

Thanks my dear friends – **Sowmya-Pradeep, Prasanthi, Bhargavi, Madhavi, Silpa, Sandhya and Rohini akka, Srilakshmi** for your encouragement and regular conversations to cheer me up when I missed home ☺

The reason for who I am today, is because of my **mother** (Smt.Ranganayaki) and **father** (Sri.Sankar) and my little **brother** (Hemanth). Amma, ne kastam nunchi, badha nunchi kuda naku dhairyenne nerpinchavu; Pappa, andari matalu bharinchi nannu PhD ki pampinchaavu; Tammu, whenever I missed you all, you cheered me via skype ☺. Life lo malli malli mimmalni happyga unche avakasam ravalani aasatho, eppatiki mee yaamu.

Beloved **Gopi**, *unnoda vazhada vazhenna vazhvu, en uzhenjam solgindradu*; looking forward for our future ☺

Lalitha S Y Nanduri

October 2014

CURRICULUM VITAE

Lalitha Sarad Yamini Nanduri

Experience:

- 2013 - present **Research & Development, Miltenyi Biotec GmbH**, Bergisch Gladbach, Germany. Post-doctoral researcher on European Union, Marie Curie funded PloidyNET project, under the supervision of Dr.O.T.Hardt/Dr.A.Bosio.
- 2009 - 2013 **University Medical Center Groningen**, Groningen, The Netherlands. PhD student on KWF funded project under the supervision of Prof.R.P.Coppes/Dr.R.P.van Os.
- 2008 - 2009 **Acharya Nagarjuna University**, Guntur, India. Pre-PhD training in environmental microbiology under the supervision of Dr.Raghuram.M
- 2007 - 2008 **Lecturer in Microbiology**, for Masters and Bachelor students at JKC college and Vikas Institute of Physiotherapy, Guntur.

Education:

- 2005 - 2007 **Acharya Nagarjuna University**, Guntur, India.
Masters in Microbiology, with University 1st
- 2002 - 2005 **Acharya Nagarjuna University**, Guntur, India.
Bachelors in Microbiology, with distinction

Publications:

Nanduri L. S. Y., Baanstra M., Faber H., Rocchi C., Zwart E., de Haan G., van Os R.P., Coppes, R. P. Purification and *ex vivo* expansion of fully functional salivary gland stem cells. *Stem Cell Reports, in Press, online 23rd October 2014.*

Nanduri L.S.Y., Lombaert, I.M.A, Van Der Zwaag M., Faber,H., Brunsting, J.F., van Os R.P., Coppes R.P. Salisphere derived c-Kit⁺ cell transplantation restores tissue homeostasis in irradiated salivary glands. *Radiotherapy and Oncology, 2013; 108(3):458-463.*

Nanduri L.S.Y., Maimets M., Pringle S.A., Van Der Zwaag M., van Os R.P., Coppes R.P. Re-generation of irradiated salivary glands with stem cell marker expressing cells. *Radiotherapy and Oncology, 2011; 99:367-372.*

Pringle, S., **Nanduri, L. S. Y.**, Marianne, v. d. Z., Ronald, v. O., Coppes, R. P., Isolation of mouse salivary gland stem cells. *J. Vis. Exp. (48), e2484, doi:10.3791/2484 (2011).*

Nanduri, L. S. Y., Baanstra M., van Os R.P., Coppes, R. P. Single cell derived mouse salivary gland organoids. (*manuscript in preparation*)

Awards and Honors:

Best Oral Presentation Award 1 st Annual PhD Student meeting of the Cancer Research Center Groningen (CRCG), The Netherlands	2013
Best Poster Prize Wolfsberg meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology, Switzerland	2013
Best Oral Presentation Award (Travel Award) 6 th Annual meeting of Dutch Society for Stem Cell Research (DSSCR), The Netherlands	2013
Selected/participated in International Summer school on Stem cells and regenerative medicine-Hydra VIII , Greece.	2012
Best Poster Prize 2 nd International Symposium of the Dutch Society for Radiobiology (NVRB), The Netherlands	2012
Klass Breur Travel Award 2 nd International Symposium of the Dutch Society for Radiobiology (NVRB), The Netherlands	2012
Ubbo Emmius Scholarship for PhD , University of Groningen, The Netherlands	2009-2013
Prof. A.S.Rao memorial Gold Medal , for University 1 st in Masters in Microbiology, 29 th Convocation, Acharya Nagarjuna University, India.	2008
Topper Gold Medal , for University College 1 st in Masters in Microbiology, Acharya Nagarjuna University, Guntur, India.	2007

Oral Presentations:

- 1st Annual PhD student meeting of Cancer Research Centre Groningen (CRCG) - **2013**
 World Conference on Regenerative medicine, Leipzig, Germany - **2013**
 6th Annual meeting of Dutch Society for Stem Cell Research (DSSCR) - **2013**
 International Symposium of the Dutch Society for Radiobiology (NVRB) - **2012**
 Annual meeting of Dutch Society for Radiobiology (NVRB) - **2010**
 3rd Annual meeting of Dutch Society for Stem Cell Research (DSSCR) - **2010**

NOTES

NOTES
