Topography-mediated Control of Cellular Response: Migration, Intracellular Crowding, and Gene-delivery

Ge, Lu

DOI:
10.33612/diss.146106454

SAMENVATTING

Met de sterke ontwikkelingen en grootse doorbraken in het veld van 'regenerative medicine', bezetten biomaterialen een zeer belangrijke positie in het verstrekken van een geschikte therapeutische optie voor het verkrijgen van een hogere kwaliteit van leven. De interactie tussen cellen en deze materialen, voornamelijk de fysicochemische (topografie en stijfheid) eigenschappen van de materialen, bepalen het cel gedrag zoals adhesie, spreiding, proliferatie, uitlijning, migratie en differentiatie. In dit proefschrift, om topografie-gemedieerde alteraties te verkennen en om sub-cellulair gedrag te onderzoeken, demonstreren we de belangrijke rol van topografie in het moduleren van cel migratie, en identificeren we de invloed van topografie op macromoleculaire verdringing (macromolecular crowding) in levende cellen. Verder zijn de topografie stimuli onderzocht voor de controle en verbetering van genafgifte capaciteit van stamcellen.

Cellen leven in een zeer dynamisch en extreem gecompliceerde, driedimensionale micro-omgeving, welke niet alleen dient als structurele ondersteuning, maar voorziet in diverse biochemische en biofysische signalen, welke cel functie en ontwikkeling reguleren. In **Hoofdstuk 1** introduceren we de cellulaire micro-omgeving, bestaande uit extracellulaire matrix, contact tussen cellen, biochemische signalen, fysiochemische parameters (bijv., mechanische eigenschappen, topografie) en markeren we de belangrijke rol van topografie voor het moduleren van celgedrag. Verder worden de modulatie van celmigratie in het wondhelingsproces, macromoleculaire verdringingssensoren en genafgifte geïntroduceerd.

In **Hoofdstuk 2** introduceren de invloed van fysicochemische (bijv., topografie, stijfheid en ruwheid), en (bio)chemische eigenschappen (bijv., materiaalcompositie en eiwitten) afkomstig van 'high-throughput screening' (HTS) platforms op verschillende soorten celgedrag (bijv., celspreiding, proliferatie, adhesion en migratie). High-throughput methoden bieden een ideale strategie voor het analyseren van duizenden combinaties van interacties tussen cellen en biomaterialen op een enkel substraat, hierbij dienend als potentieel hulpmiddel in de verduidelijking van de relaties tussen biomateriaaleigenschappen en biologisch celgedrag.

Om de voordelen van HTS methoden, zoals hierboven beschreven, optimaal te benutten, wordt in **Hoofdstuk 3** het substraat, met het topografische patroon van variabele golflengte en amplitude, gefabriceerd voor het onderzoeken van de modulatie van fibroblastenmigratie in het *in vitro* wondgenezingsproces. Hier werd voor het eerst het effect onderzocht van het loskoppelen van de normaliter gekoppelde golflengte/amplitude, op het sturen van celgedrag. De resultaten indiceren dat de topografische dimensies van de oppervlaktegolven een impact hebben op het migratiegedrag van de cellen. Het fibroblastmigratiegedrag wordt niet enkel beïnvloedt door de topografische golflengte en amplitude, maar ook door de topografische oriëntatie. Deze bevindingen suggereren dat voor het *in vitro* wondgenezingsproces de topografie van het materiaal essentieel is, en dat de topografie van de substraten bij kunnen dragen aan het ontwerp van biomedische implantaten en optimaal presterend wondverband en het ontwerpen van huidweefsel 'scaffolds'.

In **Hoofdstuk 4** wordt beschreven hoe substraten met variabele nano – of – macroschaal grootte macromoleculaire verdringing induceerden binnenin levende HEK293T cellen, waarnaast verschillende typen celdrag zijn bestudeerd op het materiaal – cel grensvlak. De resultaten laten zien dat de topografiedimensie invloed heeft de macromoleculaire verdringing in de cellen. De verhoogde verdringing kon worden gecorreleerd aan een verhoogde proliferatie, welke werd geïnduceerd door de topografie. Verder veranderden het cel spreidingsoppervlakte en nucleusoppervlakte door het golvende substraat, en de topografie, welke de hoogste macromoleculaire verdringing induceerde werd, geassocieerd met de hoogste metabolische activiteit, toegenomen proliferatie, eiwitexpressie, vergrootte focale adhesiecomplexen en myosine

spanning, en niet met YAP-TAZ transductie. Deze bevindingen bieden belangrijke inzichten in door topografie-uitgelokte macromoleculaire verdringing en bieden waardevolle informatie voor het beter begrijpen van het grensvlak tussen cellen en materialen, wat kan leiden tot vele nieuwe inzichten in de 'tissue engineering' en 'regenerative medicine' strategieën.

In **Hoofdstuk 5** zijn substraten met topografische patronen van verschillende golflengte en amplitude toegepast om de sturing van gentransfectie te bestuderen van hBM-MSCs en myoblasten. De resultaten indiceren dat de topografische dimensies invloed hebben op celspreiding, uitrekking, proliferatie en transfectiegedrag, en dat de reacties verschillen per celtype. Hogere efficiëntie van transfectie werd bereikt op de substraten met een golflengte van 2 μm voor hBM-MSCs en 10 μm voor myoblasten, in vergelijking met efficiëntie van transfectie op platte substraten. Het verhoogde genafgiftevermogen wordt mogelijk veroorzaakt door snellere afgifte, of snellere nucleaire lokalisatie, van lipoplexen, welke hoogstwaarschijnlijk geassocieerd kan worden met een verbeterde celproliferatie. Onze bevindingen benadrukken het belang van oppervlaktetopografie voor de stimulatie van genafgifte en biedt nuttige informatie over *in vitro* genafgifte, wat potentie bevat voor therapeutische, non-virale genoverdracht.

Hoofdstuk 6 is de algemene discussie over de rol van topografie in het reguleren van celspreiding, proliferatie, migratie, macromoleculaire verdringing, en genafgifte, in dit proefschrift. De golfachtige topografie en haar sub-parameters, zoals richting, golflengte, en amplitude, oefenen een belangrijke invloed uit op fibroblastmigratie in het wondgenezingsproces. Zo is gevonden dat verschillende golfeigenschappen invloed uitoefenen op intracellulaire macromoleculaire verdringingsfenomenen, welke geassocieerd kunnen worden met andere sub-cellulaire verschijnselen. Hieraan toevoegend, golfachtige topografie-medieerde verbetering van non-virale genafgifte van stamcellen. De voor de hand liggende invloed van topografie op celspreiding, proliferatie, migratie, macromoleculaire verdringing, en genexpressie benadrukt haar belang als een ontwerpparameter voor de toepassing op biomaterialen. Verder worden vooruitkijkende perspectieven besproken, over het combineren van topografie met andere parameters voor het reguleren van celgedrag.

Over het geheel genomen, representeert het werk in dit proefschrift de verkenning van topografie-gemedieerde alteraties in celgedrag en onderzoeken we de door het cel – materiaal grensvlak geïnduceerde, subcellulaire gedragingen, zoals celmorfologie, celmigratie in het wondgenezingsproces, intracellulaire macromoleculaire verdringing, en door topografie gemoduleerde genafgifte van stamcellen. Het werk toont aan dat topografie een belangrijke rol speelt in het moduleren van celgedrag, wat waardevolle informatie aanlevert voor het beter begrijpen van het cel – materiaal grensvlak, en op haar beurt kan leiden tot vele nieuwe inzichten in de 'tissue engineering' en 'regenerative medicine'.

Publications

[1] **Lu Ge**, Liangliang Yang, Reinier Bron, Janette K. Burgess, Patrick van Rijn*. Topography-mediated fibroblast cell migration is influenced by direction, wavelength, and amplitude. *ACS Applied Bio Materials* **2020**, 3, 4, 2104.

[2] Liangliang Yang[#], **Lu Ge**[#], Qihui Zhou, Taraneh Mokabber, Yutao Pei, Reinier Bron, Patrick van Rijn*. Biomimetic multiscale hierarchical topography enhances osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Adv. Mater. Interfaces* **2020**, 2000385.

[3] Liangliang Yang*, **Lu Ge**, Patrick van Rijn*. Synergistic effect of cell-derived extracellular matrix and topography on osteogenesis of mesenchymal stem cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020***,* 12, 25591.

[4] Qihui Zhou, **Lu Ge**, Carlos F. Guimarães, Philipp T. Kühn, Liangliang Yang, Patrick van Rijn*. Development of a Novel Orthogonal Double Gradient for High-Throughput Screening of Mesenchymal Stem Cells-Materials Interaction. *Adv. Mater. Interfaces* **2018**, 1800504.

[5]Liangliang Yang, **Lu Ge**, Qihui Zhou, Klaudia Malgorzata Jurczak, Patrick van Rijn*. Decoupling amplitude and wavelength of anisotropic topography and the influence on osteogenic differentiation of stem cells using a high-throughput screening approach. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, 3, 6, 3690.

[6] Liangliang Yang, Klaudia Malgorzata Jurczak, **Lu Ge**, Patrick van Rijn*. High throughput screening and hierarchical topography-mediated neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Adv. Healthcare Mater.* **2020**, 2000117.

[7] Liangliang Yang[#], Qi Gao[#], **Lu Ge**, Qihui Zhou, Eliza M. Warszawik, Reinier Bron, King Wai Chiu Laic*, Patrick van Rijn*. Topography induced stiffness alteration of stem cells influences osteogenic differentiation. *Biomater. Sci.* **2020**, 8, 2638.

In preparation

[1] **Lu Ge**, Liangliang Yang, Patrick van Rijn*. N-cadherin and substrate topography coordinate to stimulate neurogenesis of mesenchymal stem cells. (Manuscript submitted)

[2] **Lu Ge**, Liangliang Yang, Reinier Bron, Patrick van Rijn*. Topography-mediated enhancement of non-viral gene delivery in stem cells. (Manuscript submitted)

[3] **Lu Ge**, Liangliang Yang, Reinier Bron, Arnold Boersma*, Patrick van Rijn*. Macromolecular crowding in living cells is increased by surface topography. (Manuscript in preparation)

[4] Liangliang Yang[#], Sara Pijuan-Galito[#], Hoon Suk Rho[#], Aysegul Dede Eren[#], Alex Vasilevich[#], **Lu Ge**[#], Pamela Habibović, Morgan Alexander, Jan de Boer, Aurélie Carlier, Patrick van Rijn*. High-Throughput Methods in the Discovery and Study of Biomaterials and Materiobiology. (Revision and submitted to *Chemical Reviews*)

[5] Torben AB van der Boon, **Lu Ge**, Liangliang Yang, Carlos Guimaraes, Philipp Kuhn, Qihui Zhou, Patrick van Rijn*. Double orthogonal gradients; High-throughput screening to elucidate combined biomaterial properties influence on (stem) cell behavior. (Manuscript in preparation)

Grant

The De Cock-Hadders Foundation grant (2019)

Conferences

1. 30th Conference of the European Society for Biomaterials (2019): **Poster presentation**
2. 20th Annual Kolff Conference (2019): **Poster presentation**
3. 29th Annual Meeting for The Netherlands Society for Biomaterials and Tissue Engineering (2019): **Poster Presentation**
4. 29th Conference of the European Society for Biomaterials (2018): **Poster presentation**
5. 19th Annual Kolff Conference (2018): **Poster presentation**
6. 28th Annual Meeting for The Netherlands Society for Biomaterials and Tissue Engineering (2018): **Oral Presentation**
7. 27th Annual Meeting for The Netherlands Society for Biomaterials and Tissue Engineering (2017): **Poster Presentation**

Acknowledgements

I would like to express my sincere gratitude to everyone who helped and supported me during the last four years of my PhD study. I would never be here without all of you.

First and foremost, I would like to thank my supervisor Dr. **Patrick van Rijn**. I can't thank you too much for providing me the opportunity to join your group. Thank you for your guidance and mentoring on my research, and your support and suggestions on my future career. I have learned a lot from you during my PhD study. You shaped the rigorous, professional and knowledgeable scientist that I aspire to be. I admire your enthusiasm, efficiency and ability to approach complex problems with clarity and simplicity. You always provide a lot of unique insights for my results and your reaction speed is very impressive for me when we discussing. The discussions with you make the understanding of my project broaden and deeper, and I can always feel the strength from you, which helped me to face the difficulties. Thanks a lot for your help and patience, especially in writing this thesis. During my study when I made mistakes, you never blame me, but teach me how to get there in the right way. Whenever I show you the results, you always say "good", even though I know it is not really that good, and you always encourage me that "let's go for *Nature*". I greatly appreciate all your help during my PhD study and I wish you all the best in the future.

I would like to thank the members of the reading committee: Prof. **A. Salvati**, Prof. **B.N. Melgert** , and Prof .**P.Y.W. Dankers**. Thank you very much for your time and efforts in reading and approving this thesis. Your valuable comments helped me improve the manuscript.

I would like to acknowledge Dr. **J.K. Burgess**, Dr. **A. Boersma**, and Dr. **I. Zuhorn** for giving me the helpful suggestions of my project and review my manuscript. Your comments helped to improve the manuscript a lot. I learned a lot from you and I really appreciate it. And I would like to thank Dr. **T.G. van Kooten** for your help. Whenever I want to find some cell lines and not sure how to do some cell experiments you are always there to give me some suggestions. I learned a lot from you and thank you for all the help during my PhD study.

I would like to express my gratitude to the academic staff in the BME. **Henk J. Bussher**, **Henny van der mei**, **Romana Schirhagl**, **Prashant Kumar Sharma**, **Jelmer Sjollema**, **Sarthak Misra**, and **Brandon Peterson**, thank you for all the support and helpful discussion and guidance during lunch meeting as well as Kolff days.

Torben and **Valentina**, thank you very much for being my paranimphs. **Torben**, thank you for the Dutch translation of summary. I really enjoy the conversations with you, which are informative and relaxing. You let me know except for work how colorful and interesting the spare life can be. **Valen**, you are the typical beautiful, kindly and enthusiasm Italian girl, I will never forget how delicious the tiramisu you made. Working together with you two is one of the lucky things during my PhD study. We used to attend conferences, meetings, sports, boating and dinners together. There are a lot of happy moments together with you. I sincerely invite you come to China, we can share more about life. Wish you glorious future of PhD journal and colorful life.

Reinier, you are my first roommate in this department, work with you is very happy and relaxing. You are very creative, smart and kindly, making every friend feel good. You helped me with a lot of training and provided a lot of suggestions for my projects. You let me know how happily, freely and straightforward the Dutch people can be. When I feel depressed you always tell me, you can tell your feelings and go for help, it really helped a lot. Talking with you about the career let me fell

more firm what I should do in the future. It is really lucky to have you during PhD study. Wish you all the best and happy life with your family.

Min and Jing. It's very nice to meet you in life. You give us a lot of help in the beginning we came here. You are both very nice, motivative, humors, hard-working and excellent researchers. You are the good example of what a researcher should be and what a friend means. Your accompany and help make the life more easier and happier in a foreign country. Wish you all the best and fruitful results in the future.

I would also like to thanks my friends during my master study. We have been study, living and travelling together, which is the greatest thing to meet you all. **Mengdie**, you are a very nice, kindly, work very hard and do a very good research work. You have been always encouraging me to move out from the depress and make me believe in myself. Thank you for all the encouragement and supporting. **Jiaolong**, we used to work together in the same lab, I can still remember the time doing experiments with you and meeting you again in Shanghai. There are a lot of happy moments together with you. I really enjoy the conversation with you each time. We share about happiness, sadness and worries. Thanks for the accompany, concern and encouragements. **Yang**, you are a very good photographer, even though it is not your major. You are always humorous, positive, happy and can easily find the good things of life. You teach me to find a motive way even in the gloomy days. Thank you and xiaofang for sending me the surgical face mask at the first time, which is very precious in this special time (Covid-19). Wish you all the best and I am looking forward to meet you all in the near future.

Special thanks to **Wya** for all the administrative and financial support, especially at the beginning of my PhD. **Ina**, you are the most elegant and kind women I have ever been meet, and the cake you made is very delicious. **Ed**, thanks for all the hardware and software support and the nice conversation every time. **Joop**, thanks for the AFM training. I really like the tiny paper microscope on your desk, and your equipment for motor, which is very coll. I will not forget your kindly remind of half hour left almost every day in this special time. **William**, thanks for the fluorescent microscope training and the help in ML-II lab. You are responsible, humors, and professional, thank you for all the support. **Willy**, thank you for the training in DNA lab. You are very nice, and it is glad to see you every time. **Gesinda**, thank you for your help and support, you are kindly, responsible, and reliable. **Marja**, it is happy to work with you and share the office for a period, you are very humors, nice and motivate. Thanks for all the support of **Betsy**, **Hans**, and **Jelly**. It been a good memory to meet you all in this department and I wish you in good health and happiness in the future.

Thank all the group members, **Damla**, **Guangyue**, **Lei**, **Taraneh**, **Lais**, **Gwenda**, **Ana Maria**, **Eliza**, **Mohammad**, **Klaudia**, **Clio** and **Devlina**. It is really happy to join this big family, work with you and get together with you. Many thanks to all Chinese friends, **Xiaoxiang**, **Lu Yuan**, **Hongping**, **Yanyan**, **Can**, **Yuchen**, **Linyan**, **Huaiying**, **Kaiqi**, **Yue**, **Runrun**, **Ke**, **Zhiwei**, **Hao**, **Zhengya**, **Yiyang**, **Chuang**, **Yuanfeng**, **Linzhu**, **Ruifang**, **Yafei**, **Yiwen**, **Kecheng**, **Chengxiong**, as well as all BME colleagues, **Rokashana**, **Maria**, **Abigail**, **Jeroen**, **Kiran**, **Aryan**, **Alina**, **Yori**, **Thea**, **Viraj**, **Aldona**, **Klaudia**, **Thamir**.

I would like to give my great thanks to my husband, **Liang**. Meeting with you is the best thing ever happen in life. We have spent a lot of moments together and they are precious memory in life. You are like my friend and master, letting me know how to do research and live a meaningful life. Whatever happens in life, you are always there. Thank you for the accompany, trust and love.

Last but not least, Dear **Mom** and **Dad**, I am so grateful for your endless love and support to me. The love you give to me makes me choose freely and it is the most important motivation to go forward. You are the best parents in the world and my strongest backing forever. Thanks for the care and support by my **grandparents**. Hope you all in good health and happy every day. Thanks for my sisters to take care of my parents and support me. My nephew **Ruichen**, **Fengze**, and niece **Miaomiao**, you are the best gift that I can ever receive from the God. You give me a lot of happiness and joy, wish you grow healthy and happily.

亲爱的爸爸妈妈，谢谢你们的养育和教导，你们给我无尽的爱让我可以自由选择和勇敢地追逐梦想。你们是世上最好的父母，也是我前进的无限动力和坚强后盾。愿你们身体健康，每天开心。亲爱的爷爷奶奶，姥爷谢谢你们对我从小的关心与呵护，你们给了我很多支持和爱护，祝您们身体安康，笑口常开。亲爱的姥姥，谢谢您从小对我的关爱和支持，您总是那么慈祥、睿智和聪慧，您是我的榜样，希望您在天堂一切安好。

此外感谢我的姐妹对父母的照顾和对我的支持和帮助，让我安心在外学习。也谢谢我的外甥睿辰、沣泽和外甥女淼淼对我的陪伴，你们是上天的礼物，你们的到来给我带来了无限的欢乐和幸福。希望你们健康快乐地长大，以梦为马，不负韶华。

盖璐
Lu Ge
Oct, 2020
Groningen, Netherlands