

University of Groningen

Self-assembling nanofiber hydrogels to attenuate epithelial mesenchymal transition in lens epithelial cells

da Cruz Barros, Raquel Sofia

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:

2018

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

Citation for published version (APA):

da Cruz Barros, R. S. (2018). *Self-assembling nanofiber hydrogels to attenuate epithelial mesenchymal transition in lens epithelial cells*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. 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.

SAMENVATTING



In dit proefschrift zijn studies beschreven waarin gel-achtige biomaterialen gebruikt zijn om het gedrag van lens epitheel cellen te beïnvloeden. De gelen zijn opgebouwd uit moleculen in de vorm van damstenen die zichzelf aaneenschakelen tot nanovezels. Verder is een gedeelte van deze moleculen uitgerust met korte aminozuur ketens (peptides) die van nature voorkomen in adhesie eiwitten waaraan cellen kunnen verankeren. Tezamen vormen deze elementen een hydrogel, waarbij hydro verwijst naar de grote hoeveelheid water die in het systeem gebonden kan worden. Het doel van het gebruik van deze geavanceerde hydrogelen is met name om de overgang van epitheel cellen naar mesenchymale cellen te remmen of zelfs te voorkomen. Dit celgedrag wordt EMT (epitheel – mesenchym transitie) genoemd en komt onder andere in de ooglenzen voor als in dit systeem wordt ingegrepen, zoals bij de plaatsing van een intra-oculaire lens. Een belangrijk praktisch voordeel van het gebruik van een hydrogel is hierbij dat het injecteerbaar is en zodoende minimaal invasief is aan te brengen.

De eigenschappen van de zelf-assemblerende nanovezels zijn afhankelijk van de moleculaire bouwstenen. Om de meest geschikte eigenschappen te selecteren werden de nanovezels afkomstig van drie verschillende moleculen in eerste instantie als een vezelmat gebruikt waarop drie verschillende celtypen konden hechten en groeien. In **hoofdstuk 2** laten we zien dat de keuze van bouwstenen in zelfassemblerende nanovezelsystemen kan worden gebruikt om het gedrag van cellen te reguleren. De tweedimensionale (2D) vezelstructuren met hun fysische en chemische eigenschappen vertoonden verschillende invloeden op het gedrag van lens epitheelcellen, fibroblasten en mesenchymale stamcellen. Dit uitte zich in de morfologie van de celhechting, alsmede metabole activiteit en de gen- en eiwitexpressie gerelateerd aan de EMT respons. De meest hydrofiele nanovezel met een compacter netwerk bestaande uit dunne vezels bleek een gunstige 2D-omgeving te bieden voor celproliferatie en extracellulaire matrixvorming. Het EMT gedrag werd in alle celtypen verlaagd in vergelijking met de veel gebruikte controle materialen tissue culture polystyreen en een collageen type I coating. Deze nanovezel demonstreert het potentieel om te worden gebruikt als een biomimetische coating om de ontwikkeling van EMT en daarmee gepaard gaande fibrose te reduceren. Deze studie toont ook aan dat nanovezelstructuren de celfunctie niet per definitie verbeteren, zoals dat in de literatuur toch vaak vermeld wordt. De fysisch-chemische eigenschappen van de nanovezels beïnvloeden mede het celgedrag en kunnen daarmee worden gebruikt om het gedrag van cellen te regelen in de richting van suboptimale prestaties.

Gebaseerd op de inzichten uit **hoofdstuk 2** over de invloed van chemie- en bevochtigbaarheids eigenschappen op celgedrag, werd een moleculaire bouwsteen met vergelijkbare eigenschappen gekozen waarmee gelen met een laag moleculair gewicht (LMWG) gemaakt kunnen worden. De moleculen kunnen voorzien worden van biologische activiteit door er peptiden aan te hangen die voorkomen in adhesieve eiwitten die onderdeel uitmaken van de extracellulaire matrix. De keuze van de peptiden was gebaseerd op de wetenschap dat de epitheelcel polariteit verloren gaat tijdens het EMT-

proces en dat het loslaten van de zo genoemde basaalmembraan celmigratie mogelijk maakt, hetgeen een kenmerkend element van EMT is. In **hoofdstuk 3** werden gels op basis van LMWG en gefunctionaliseerd met peptiden afgeleid van laminine, collageen en fibronectine gebruikt om de effecten van de matrix samenstelling op hun potentieel als modulators van EMT in lensepitheel cellen te onderzoeken. Cellen werden gezaaid op of onder de gels en werden geanalyseerd op metabole activiteit, morfologie, α -smooth muscle actine (α -SMA) expressie en EMT gerelateerde genexpressie. De aanwezigheid van de peptiden verhoogde de metabole activiteit van de cellen vergeleken met LMWG zonder peptiden. Alleen epitheelcellen uitgezaaid bovenop het basaalmembraan (BM) mengsel en op Matrigel waren in staat uit te groeien tot een monolaag van cellen met gelijkenis op hun natuurlijke morfologie. De expressie van α -SMA-vezels op het eiwitniveau en de mRNA-expressie van andere EMT-gerelateerde, fibrotische genen waren echter hoger op Matrigel. In het algemeen was het BM-mengsel in staat om de cellen in een lagere fibrotische toestand te houden dan de andere gels waaronder ook Matrigel. De gegevens suggereren dat juist gekozen gel-peptide combinaties het optreden van EMT kan afzwakken en wellicht kan voorkomen.

Nadat het BM-mengsel gunstige resultaten had opgeleverd, werd een nieuw studiemodel ontwikkeld zoals beschreven in **hoofdstuk 4**. Hoewel laminine een van de belangrijkste bestanddelen van het basaalmembraan in de oog lens is, heeft de combinatie van de laminine peptiden IKVAV en YIGSR geen voordeel opgeleverd voor de overleving van lensepitheel cellen zoals geconcludeerd in **hoofdstuk 3**. Een nieuwe combinatie van fibronectine en collageen-afgeleide peptiden werd gebruikt in hoofdstuk 4. LMWG alleen en in combinatie met peptiden van laminine (IKVAV en YIGSR), fibronectine en collageen (RGD en DGEA), alsmede de basaalmembraan combinatie werd bestudeerd in contact met lensepitheel van geprepareerde varkenslenzen in een lenskapselzak model. De natuurlijke lens ligt opgesloten in een collageen-rijke membraan die ook wel kapselzak wordt genoemd. De lens kan uitgerepareerd worden uit ogen die uit het slachthuis verkregen worden. Deze ogen vormen een belangrijke en dankbare bron voor wetenschappelijk onderzoek en tevens voor de klinische praktijk als oefen materiaal voor chirurgische technieken. Het gebruik van lensepitheel cellen in hun natuurlijke omgeving staat ons toe om celveranderingen te bestuderen die het gevolg zijn van hun interactie met biomaterialen en niet zozeer van de stress die gerelateerd is aan isolatie en kweken van cellen in een meer kunstmatige omgeving. In **hoofdstuk 4** wordt beschreven hoe een lenskapsel model is gebruikt om de effecten van blootstelling van cellen aan bioactieve hydrogels te onderzoeken. EMT gerelateerde veranderingen zoals verlenging van het cytoskelet, toename van de kerngrootte en daling van de celdichtheid werden geïdentificeerd. Wijziging op het eiwitniveau werd ook gedetecteerd zoals de productie van α -SMA. De lamininmotieven creëerden celdood vermoedelijk via apoptose. Ondanks de uitgesproken celregeneratie in contact met de hydrogelen met een mengsel van fibronectine en collageen motieven nam EMT toe. De hydrogel die het qua samenstelling het meest lijkt op het basaalmembraan vertoonde een grote vertraging in EMT. In **hoofdstuk 4** werd een *ex vivo* model gecreëerd dat de interactie van lensepitheelcellen met hydrogelen mogelijk maakte in een vergelijkbare postoperatieve omgeving. Naast de

preventie van EMT door een van de bioactieve hydrogels moet het percentage peptiden verder worden onderzocht ten behoeve van een totale remming van EMT.

In dit proefschrift werden ook nieuwe benaderingen voor onderzoek en detectie van hoornvliesepitheel schade onderzocht. In **hoofdstuk 5** werd de mechanische schade aan het hoornvlies door het gebruik van wrijvingsverlagende middelen geanalyseerd. Een innovatieve wrijvingsmeter (tribometer) werd gebruikt om de wrijving te meten, en de schade aan het epitheel werd gemeten met confocaal microscopische technieken. Glycerine is een algemeen wrijvingsverlagend middel dat wordt toegevoegd aan kunstmatige tranen om zo de bevochtiging van het oog te stimuleren en tegelijkertijd de wrijving tussen hoornvlies en ooglid te verminderen. Een tribometer met minimale interventie met de tranenfilm op het hoornvlies van een varkensoog onthulde een lage wrijvingscoëfficiënt van 0.011 in een glyceroloplossing. Glycerinemoleculen binden vermoedelijk aan water, mucines en epitheelcellen en verbeteren daarmee zowel de zogenoemde 'squeeze' film als de smering in het grensvlak. Met behulp van de confocaal microscopie werd het duidelijk dat de glyceroloplossing de schade aan de epitheellaag met 50% reduceerde in vergelijking met een fosfaatgebufferde zoutoplossing.

In **hoofdstuk 6** worden de theorie en uitvoerbaarheid van het werk in dit proefschrift besproken in het licht van verdere verbeteringen van de concepten en implicaties voor toepassing van hydrogelen.