



## **Samenvatting en toekomst visie**

## SAMENVATTING

Voor meer dan een eeuw zijn miljoenen man uren aan onderzoek zijn gespendeerd in het oplossen van de fundamentele werktuigkundige problemen ten aanzien van het ontsnappen aan de Aardse zwaartekracht en de ontwikkeling van aandrijvingsystemen voor ruimtevaartuigen. Zelfs nu is de moeite en tijd geïnvesteerd in onderzoek en ontwikkeling in de technologische kant van de ruimtevaart substantieel, dit alles is te danken aan de wens van de mensheid om onze Maan nogmaals te bezoeken en vandaar een landingsexpeditie naar de planeet Mars op te zetten. Hoe mensen eigenlijk gaan overleven en werken in de ruimte voor zeer lange tijd is een zaak waar het hele scala aan fysiologische en biologische wetenschappen voor nodig zijn en is geworden tot een van de grootste uitdagingen binnen de exploratie van ons zonnestelsel. Een fundamentele stap om deze uitdaging tot een goed einde te brengen is begrijpen wat de effecten van veranderende zwaartekracht omstandigheden zijn op cellichamen. Over die effecten gaat dit proefschrift.

Biologie (cellen), materialen (microgroeven) en kracht (gravitatie) zijn de interactieve aspecten van dit onderzoek, gezamenlijk zijn ze onderdeel van het grote onderzoeksveld van de tissue engineering, en beïnvloeden het gedrag en levensduur van kunstmatige materialen in levend weefsel. **Hoofdstuk 1** beschrijft in brede zin onze huidige kennis van cel biologie en cel respons op zowel statische als dynamische krachten. Er wordt kort ingegaan op de fabricatie van ondergronden met een topografie en de verschillende fysieke fenomenen zoals die voorkomen in een veranderende zwaartekracht omgeving.

## FIBROBLAST GEDRAG OP GECOMBINEERDE TREKKRACHTEN EN MICROGROEVEN

De eerste studie was gericht op het verkrijgen van een algemeen beeld van cel respons op een ondergrond voorzien van een microgroef topografie en mechanische stress. **Hoofdstuk 2** beschrijft de invloed van unilaterale cyclische trekkracht en de daaruit volgende tendens van fibroblasten om zich haaks te oriënteren op de stress richting. Overeenkomstige cel oriëntatie kan worden geïnduceerd door cellen te geleiden langs topografische richels en groeven. Het doel van de studie was het evalueren van cel gedrag op microgroef substraten en blootgesteld aan cyclische trekkracht. De hypothese was dat cel vorm hoofdzakelijke wordt bepaald door topografie. Op basis van voorgaande studies, werd er gekozen voor een 10 micron wijde vierkante groef en een 40 micron wijde V-vormige groef patroon. Gladde substraten diende als controle. Op alle drie de type substraten werden fibroblasten gezaaid en een 1 Hz cyclische trekkracht op los gelaten (0, 4, of 8%) voor een periode van 3 tot 24 uur. Cellen werden voorbereid op verder analyse met scanning electron microscoop, immuno-kleuring van actine filamenten, alignement metingen en PCR (collageen type I, fibronectine,  $\alpha$ 1- en  $\beta$ 1-integrinen). Resultaten lieten zien dat cellen zich oriënteren op alle gegroefde ondergronden en fluorescentie microscopie toonde eenzelfde oriëntatie van intracellulaire actine filamenten. Na 3 uur van trekken, begint cel oriëntatie en na 24 uur hebben cellen zich vrijwel volledig georiënteerd. Beeld analyse liet een verbeterd alignement zien bij diepere groeven. Statistiek bewees dat de parameters groef type, groef richting en tijd alle significant waren, maar de trekkracht variatie niet. Substraten met groeven haaks ten opzichte van de trekrichting leidde tot een beter cel oriëntatie. De expressie van  $\beta$ 1-integrine en collageen-I was hoger in de experiment groepen. Concluderend kunnen we onze hypothese handhaven, omdat microgroef topografie het meest effectief was in het aanwenden van spanning relatief op de lengte as van de cel en trekkracht alleen leidde tot secundaire effecten op de cel.

## FIBROBLAST RESPONS OP EEN COMBINATIE VAN HYPERGRAVITATIE EN MICROGROEVEN

Mechanische stress is een belangrijke regulator van cel vorm en extracellulaire matrix component productie. Het denkbeeld dat veranderingen in cel vorm als gevolg van variabele zwaartekracht bijdraagt aan het idee van directe effecten van zwaartekracht op cellen leidde tot de studie zoals beschreven in **hoofdstuk 3**. Deze studie rapporteert over de verschillen in morfologisch gedrag tussen fibroblasten gekweekt op gladde en gegroefde ondergronden (groef diepte: 1  $\mu\text{m}$ , breedte: 1, 2, 5, 10  $\mu\text{m}$ ), welke hyperzwaartekracht ondergaan door middel van centrifugatie (10, 25 en 50 g; 1 g voor de controle). Het doel van de studie was het duidelijk maken welke van deze parameters het belangrijkste is in het bepalen van cel gedrag. Morfologische karakteristieken werden onderzocht met scanning electron microscopie en fluorescentie microscopie voor het verkrijgen van kwalitatieve informatie over cel spreiding en alignment. Confocal laser scanning microscopie liet de verdeling van actine filamenten en vinculine anker punten zien door immuno-kleuring. Ook de expressie van collageen type I, fibronectine en  $\alpha 1$ - en  $\beta 1$ -integrinen werden onderzocht met PCR. Microscopie en beeld analyse toonde aan dat fibroblasten zich oriënteren langs de groef richting op alle gestructureerde ondergronden. Op het gladde substraat (controle groep) vertoonden cellen een willekeurige cel spreiding. The oriëntatie van cellen gekweekt op gegroefde verbeterde bij hogere g-krachten tot een optimum was bereikt bij 25 g. ANOVA analyse van de data voor alle parameters: topografie, zwaartekracht en tijd bleek uit te wijzen dat alle parameters significant verschil uitmaken. Daarnaast waren de meeste gen expressie niveaus verlaagd onder hypergravitatie. Toch lijkt het erop dat collageen type I en fibronectine niveaus onbewogen blijven door tijd of kracht. Uit onze data concluderen we dat fibroblasten zich voornamelijk aanpassen aan de morfologie van hun omgeving, zoals het substraat oppervlak, terwijl een secundaire, maar significante rol is weggelegd voor hyperzwaartekracht.

## REACTIES VAN FIBROBLASTEN OP EEN INTERACTIE VAN MICROGRAVITATIE EN MICROGROEVEN

Hoewel mechanische belasting belangrijk is, kunnen cellen ook mechanische ontlasting ervaren door de meest constante natuurkracht, namelijk zwaartekracht, te verwijderen. **Hoofdstuk 4** handelt over de eerste van twee studies welke de effecten van microgravitatie op cel gedrag bekijken door *in vitro* gebeurtenissen te beschrijven over de verschillen in morfologisch gedrag tussen fibroblasten gekweekt op gladde en microgroef substraten (groef diepte: 0.5  $\mu\text{m}$ , breedte: 1, 2, 5, 10  $\mu\text{m}$ ), welke onderworpen worden aan gesimuleerde gewichtloosheid. Het doel van de studie is er achter komen welke parameter determinerend is in het sturen van cel gedrag. Morfologische kenmerken als cel vorm, oriëntatie en cel oppervlak werden onderzocht met scanning electron en fluorescentie microscopie. Confocal laser scanning microscopie visualiseerde de actine filamenten en focale adhesie punten. Ook werd de expressie van collageen type I, fibronectine en  $\alpha 1$ - en  $\beta 1$ -integrinen bekeken met PCR. Microscopie en beeld analyse lieten zien dat fibroblasten zich voegde naar de groef richting op alle gegroefde patronen. Op gladde ondergronden lieten cellen een willekeurige cel spreidingsvorm zien. De alignment van cellen gekweekt op gegroefde oppervlakte verminderde onder gesimuleerde microgravitatie, in het bijzonder na 24 uur kweken. Cel oppervlak grootte was aanzienlijk kleiner dan op gladde substraten, maar gesimuleerde microzwaartekracht leidde tot een vergroting van cel oppervlak van cellen gekweekt op gegroefde substraten. ANOVA werd toegepast op alle parameters; topografie, zwaartekracht en tijd. Uit deze analyse kwam naar voren dat alle parameters een significant verschil uit maakte. Gen expressie niveaus waren verlaagd als gevolg van microgravitatie, vooral  $\beta 1$ -integrine en fibronectine. Uit onze data kan worden geconcludeerd dat

fibroblasten hun vorm aanpassen aan de fysieke omgeving zoals de substraat textuur, microgravitatie heeft een weliswaar significant, maar secundaire rol.

#### ACTIVATIE VAN MAPK ROUTES IN FIBROBLASTEN TIJDENS MICROGRAVITATIE

**Hoofdstuk 5** breidt de kennis opgedaan in de vorige studie uit door te kijken naar het intracellulaire moleculaire mechanisme welke de extracellulaire cel respons bemiddelt. Mechanotransductie is een belangrijke drijfveer achter deze studie waarin de morfologie van fibroblasten werd vergeleken die gekweekt waren op zowel gladde als gegroefde ondergrond (groef diepte: 0.5  $\mu\text{m}$ , breedte: 1  $\mu\text{m}$ ) en werden blootgesteld aan microzwaartekracht. Morfologie werd onderzocht met behulp van scanning electron microscopie en fluorescentie microscopie werd gebruikt om kwalitatieve informatie over cel alignement te verkrijgen. Confocal laser scanning microscopie visualiseerde de actine filamenten en focale adhesie punten. Expressie van collageen type I en  $\alpha 1$ -,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ -integrinen werd geanalyseerd met QPCR. Immunoblotting werd toegepast om de verschillende proteïnes van de MAPK signalering routes zichtbaar te maken. Microscopie en beeld analyse liet zien dat fibroblasten op gegroefde ondergrond zich georiënteerd hadden langs de groeven. Gladde substraten resulteerde in fibroblasten met willekeurig spreidingspatroon. De oriëntatie van cellen op een microgroeven oppervlak tijdens microgravitatie na 48 uur verschilt nauwelijks van de 1 g controle groep, hoewel cel vorm wel verschilde. ANOVA analyse bewees dat alle parameters een significante invloed hebben op cel oriëntatie. Microzwaartekracht reduceerde expressie van voornamelijk  $\beta 3$ -integrin en collageen. Alpha-1 en beta-1 integrinen waren echter opgereguleerd. ERK1/2 was verminderd in 0 g hoewel JNK/SAPK en p38 actief bleven. The familieleden van de kleine GTPases waren gestimuleerd tijdens microgravitatie, in het bijzonder RhoA en Cdc42.

De resultaten zijn conform het gegeven dat microgravitatie fibroblasten ertoe aanzet hun morfologie en expressie van cel-substraat proteïnen aan te passen via de MAPK intracellulaire signalering routes. We concluderen dat fibroblasten op een gegroefd patroon hun vorm al zo dus aanpassen en dat dit model kan worden gebruikt om de effecten van zwaartekracht perceptie en cel respons te ontrafelen.

#### MECHANOSENSITIVITEIT VAN FIBROBLASTEN OP INERTIËLE SCHEERKRACHTEN

Al enige jaren is inertieële scheerkracht, welke inherent is aan centrifugatie, beschreven als theoretisch model. Uit dit model kwam naar voren dat inertieële scheer resulteert in artefacten welke de uitkomst beïnvloedt van controle monsters welke gecentrifugeerd worden bij 1 x g aan boord ruimtevaartuigen. In **hoofdstuk 6** voerde we een studie uit waar *in vitro* geprobeerd werd te achterhalen wat de invloed is van inertieële scheer krachten op fibroblast cellen gekweekt op polystyreen substraten, zowel glad als gegroefd (groef diepte: 0.25  $\mu\text{m}$ , breedte: 1  $\mu\text{m}$ ). Deze cellen werden geplaatst in een centrifuge in aangepaste kweek dozen. Monsters werden onderworpen aan 0, 1.5 en 3.0 Pascal (N/m) voor 0.5, 2 en 4 uur. Om de invloed van inertieële scheer vast te stellen analyseerde we zowel de cel morfologie (scanning electron en fluorescentie microscopie) alsook op een moleculair niveau (mRNA transcriptie en Western blotting). Het achterliggende doel was het begrijpen in hoeverre scheer krachten cel gedrag kan beïnvloeden en welke parameter het belangrijkste is in het bepalen van de cel respons. Microscopie en beeld analyse toonde aan dat fibroblasten zich oriënteerde langs de groef richting en een willekeurige spreiding vertoonde op gladde substraten. Alignement van cellen op microgroeven tijdens inertieële scheer kracht is na 4 uur kweken heel anders in vergelijking met de 0.0 Pa controle groep. Actine filament aantallen en dikte waren verminderd en het aantal talin ankerpunten gereduceerd.

ANOVA was toegepast op de belangrijkste parameters: topografie, scheer kracht en tijd. Uit deze analyse bleek dat alle parameters significant waren. Daarnaast, waren gen niveaus gereduceerd als gevolg scheer kracht in het bijzonder die van beta-3 integrin en alpha-1 integrin. Collageen type I en beta-1 integrin waren juist verhoogd. Erk1/2 was aanwezig en JNK/SAPK en p38 waren verhoogd tijdens scheer kracht. The familieleden van de kleine GTPases waren gestimuleerd tijdens scheer kracht, vooral RhoA en Cdc42.

Inertiële scheer kracht is in vergelijking met de zwaartekracht versnellingscomponent tijdens een nagebootste microgravitatie studie een kracht waar rekening mee moet worden gehouden, omdat ze een aanzienlijke impact heeft op gehechte cel kolonies. Inertiële scheer kracht moet in de interpretatie van resultaten van ruimtevlucht en grond data worden meegenomen.

#### NANOTOPOGRAFIE EN DE ORIËNTATIE LIMIETEN VAN FIBROBLASTEN

Een van de belangrijkste parameters van de voorgaande hoofdstukken is topografie. Een gestructureerde, groef/richel oppervlak van bekende afmetingen, en waarvan we weten welke cel respons dit patroon kan opwekken. Omdat deze oppervlakken de natuurlijke situatie nabootsen, zijn deze patronen intensief bestudeert. Echter, collageen fibrillen, welke de natuurlijke omgeving vormen van dermale fibroblasten, zijn kleiner van schaal (nano meters) dan de momenteel gebruikte substraten (micro meters). Als gevolg van wat technische haalbaar was en de wetenschap dat collageen fibrillen samenklonteren tot structuren vele malen groter dan een enkele fibril hebben we gebruik gemaakt van deze microgroeven tot nu toe. In samenwerking met Philips Research, hebben we nu de mogelijkheid om de verschillen in morfologie gedrag te bestuderen van fibroblasten op gladde en echte nano-groef substrata (groef diepte: 5 – 350 nm, breedte: 20 – 1000 nm) *in vitro*. Het doel van deze studie in **hoofdstuk 7** was het ophelderen in hoeverre cel geleiding voorkomt bij een steeds kleinere topografie. Matrijzen van patronen werden gemaakt met electron beam lithografie en werden gerepliceerd in polystyreen cel kweek materiaal. De replica's werden gekarakteriseerd met de atomic force microscoop (AFM). Na het zaaien van fibroblasten, werden de morfologische eigenschappen onderzocht met scanning electron microscopie en licht microscopie, zodat kwalitatieve en kwantitatieve informatie kon worden verkregen over cel alignment. AFM liet zien dat nanogroef/richel breedtes perfect werden gerepliceerd, hoewel in diepere delen van de groef meer concaaf waren. De gladde substrata lieten geen kenmerkend patroon zien, behalve een ruwheid van 1 nm. Microscopie en beeldanalyse van fibroblast oriëntatie liet zien dat na 4 uur cellen zich hebben gevormd naar het nano-topografische patroon tot een groote van 100 nm breed en 75 nm diep. Na 24 uur kweken, oriënteren fibroblasten zelfs naar nog kleinere dimensies: 35 nm groef diepte. Blijkbaar is diepte de meest belangrijke parameter in cell alignment op groef patronen met een pitch ratio van 1:1. Op gladde ondergronden groeiden cellen uit tot een willekeurige spreidings patroon. Variantie analyse (ANOVA) bewees dat zowel topografie als kweek tijd een significante invloed heeft op celgedrag. Wij concluderen dat fibroblast cellen gekweekt op nanotopografie een drempelwaarde ervaren ter groote van 35 nm, onder deze waarde vindt er geen contact geleiding meer plaats.

#### AFSLUITENDE OPMERKINGEN EN TOEKOMST VISIE

In dit proefschrift is de interactie tussen statische en dynamische factoren onderzocht vanuit het perspectief van de cel mechanotransductie. Door het nabootsen van een fibril uiterlijk door middel van oppervlak topografie op een biomateriaal en door cellen bloot te stellen aan een stressvolle omgeving zijn we erin geslaagd meer inzicht te verkrijgen in de mechano- en gravitatie gevoeligheid van primaire fibroblasten.

Gravitationele cel biologie uitgevoerd op Aarde is een onderzoeksveld met een rooskleurige toekomst: menselijke nieuwsgierigheid en wil om de natuurlijke wereld te begrijpen, van de oceaan dieptes tot de verre ruimte, gecombineerd met de lage kosten en hoge beschikbaarheid van apparatuur maakt dat verder onderzoek mogelijk is. De resultaten zoals beschreven in dit proefschrift en in het werk van anderen heeft laten zien dat de uitkomsten van ground-based onderzoek vergelijkbaar is met resultaten zoals gevonden in “echte” gewichtloosheid.

De groefpatronen op micron schaal gebruikt in de eerste hoofdstukken was een zeer –misschien wel te– dominante factor, vandaar dat toekomstig onderzoek zich zou moeten richten op het uitbreiden van de huidige kennis door het combineren van cellen gekweekt op een nanotopografie en onderworpen aan mechanische (on)belasting op verschillende manieren. Dit resulteert waarschijnlijk in een verbeterde interactie tussen de verschillende parameters. Analyse van cel terugkoppeling zou op een brede schaal moeten plaatsvinden: van de visualisatie van morfologische veranderingen van cel vorm door middel van microscopie tot kwantificeerbare data verkregen via moleculaire analyse methodes zoals Q-PCR en in het bijzonder SDS-PAGE en Western blotting. Het volgen van de cel in real-time tijdens experimenten zal niet alleen positief bijdragen aan ons begrip van cel gedrag, maar ook de ontwikkeling stimuleren van hoogwaardig experiment hardware. Verbindingen leggen tussen processen in de cel en het uiterlijk van de cel zullen een licht werpen op welke mechanismen cellen exact gebruiken in hun respons op omgevings stimuli. Deze fundamentele kennis kan ook gunstig zijn in de constructie en toepassing van biomaterialen geschikt voor reparatie en regeneratie van nieuwe en functionele weefsels.