



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Development of an *in vitro* vascular network using zebrafish embryonic cells

Ibrahim, M.

Citation

Ibrahim, M. (2017, June 13). *Development of an in vitro vascular network using zebrafish embryonic cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/50874>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/50874>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/50874> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Ibrahim, M.

Title: Development of an in vitro vascular network using zebrafish embryonic cells

Issue Date: 2017-06-13

Nederlandse samenvatting

De ontwikkeling van een *in vitro* vasculair netwerk is momenteel een van de grootste uitdagingen in weefselkweek en regeneratieve geneeskunde. Er zijn meerdere technieken ontwikkeld om vasculaire netwerken te kweken waarbij cellen en weefsel van zoogdieren worden gebruikt, maar het is wenselijk om alternatieve modellen te ontwikkelen die doeltreffend, toegankelijk en grootschalig beschikbaar zijn. De zebravis bezit deze voordelen en ontwikkelt zich tot een model proefdier in verschillende onderzoeksgebieden. Voor *in vitro* studies zijn de extern bevruchte grote hoeveelheden aan zebravisembryo's een uitstekende bron van primaire embryonale cellen, die in andere soorten minder makkelijk te verkrijgen zijn. Beschikbaarheid van een aantal vasculaire transgene lijnen en de regeneratieve capaciteit van de zebravis maakt dit model nog belangrijker in dit onderzoeksgebied.

De ontwikkeling van bloedvaten is een complex proces, wat onder andere bestaat uit differentiatie en migratie van endotheelcellen, die vervolgens een buis vormen. Het proces wordt verder gestuurd door ondersteunende celtypen, eiwitfactoren, extracellulaire matrix moleculen en de bloedstroom. Door deze componenten *in vitro* te combineren hebben onderzoekers recent een op celkweek gebaseerd vasculair netwerk ontwikkeld, inclusief doorbloeding. De vorming van een functioneel vasculair netwerk dat grote gelijkenis vertoont met fysiologische bloedvaten blijft echter een uitdaging.

De celculturen die we in deze studie hebben ontwikkeld zijn een stap in de richting van het beter begrijpen van de *in vitro* ontwikkeling van het vasculaire netwerk van de zebravis. De zebravis embryoid body (EB) en weefsel explantatie modellen die wij hebben ontwikkeld, zijn veelbelovende, aanvullende modellen naast de huidige zoogdieren embryonale stamcel en weefsel explantatie modellen, voor het bestuderen van *in vitro* vasculaire ontwikkeling. De EB celkweken kunnen gemakkelijk in grote aantallen worden opgezet. De isolatie van weefsel explantaten van kleine embryo's vereist echter technische expertise die door oefening moet worden verkregen.

Op basis van onze resultaten kunnen embryonale cellen van de zebravis worden gebruikt om vasculaire netwerken te groeien. In de huidige situatie kan de zebravis echter niet het zoogdier celcultuur model vervangen, maar wel als een complementair model worden gebruikt. De grootte van het vasculaire netwerk dat in onze culturen werd gevormd, was kleiner dan eerder beschreven voor muis en menselijke embryonale cel- en weefselkweek. Dit kan komen door de beperkte beschikbaarheid van technieken voor zebravissen in dit onderzoeksveld. Verder onderzoek naar het zebravismodel met betrekking tot dit onderwerp moet meer informatie verstrekken over de vorming van *in vitro* vasculaire netwerken.

In **Hoofdstuk 2** hebben we een overzicht gegeven van de beschikbare technieken voor het kweken van vasculaire netwerken en hun mogelijke toepassingen onderzocht. Er zijn

maar weinig studies met dit doel waarin gebruik wordt gemaakt van zebravis cellen. Gebaseerd op de algemene celkweek technieken die ontwikkeld zijn voor de zebravis, geloven wij dat het merendeel van de technieken voor het kweken van vasculaire netwerken met behulp van zoogdiercellen en -weefsels kan worden aangepast voor de zebravis. Vanwege diens algemene voordelen (zoals lage kosten, externe bevruchting) kan de zebravis een belangrijke eerste stap zijn voor het bestuderen van *in vitro* vasculaire ontwikkeling. Er zijn echter enkele nadelen van het zebravismodel, zoals het combineren van cellen van genetisch diverse embryo's in de celcultuur (de zebravis is genetisch polymorf), een vereist voedselrijk medium en de vereiste van, zoals in sommige studies aangegeven, een voedingslaag van stromale cellen om de ongedifferentieerde toestand van de primaire embryonale celkweken te behouden.

In **Hoofdstuk 3** hebben we de minimale vereisten van de voedingsstoffen voor de zebravis blastocyst celkweek geoptimaliseerd. Wij vonden voor optimale groei, dat de primaire blastocyst cellen 15% foetaal runder serum (FBS) en 60 ug/mL zebravisembryo extract (ZEE) in het medium nodig hebben. We vonden dat endotheelcellen spontaan differentieerden in de zebravis blastocyst celculturen. Met behulp van transgene lijnen (*fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen) konden we de verdere ontwikkeling van deze cellen volgen tot dag 4 van de kweek onder basale kweekcondities (wanneer ze in hoeveelheid afnemen).

Gedurende de kweek verminderden de meeste van de gedifferentieerde cel types (we namen ook neuron-achtige cellen en pigment cellen samen met de *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen waar) en een subpopulatie van cellen bleek in aantal toe te nemen. Door continue de blastocyst celculturen door te kweken, krijgen de secundaire cellen een fibroblast-achtige morfologie. Deze cellen vertonen een optimale groei bij een lagere concentratie FBS (10%) en zonder ZEE in het medium.

In **Hoofdstuk 4** hebben we geprobeerd om de hoeveelheid *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* celpopulaties in de blastocyst celculturen te verhogen door de kweekomstandigheden te manipuleren. We gebruikten verschillende media samenstellingen, substraten en vasculair endotheel groeifactor (VEGF) concentraties om optimale omstandigheden voor de groei van *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen te vinden. We vonden dat het LDF medium dat eerder is geoptimaliseerd voor de zebravis blastocyst celkweek aangevuld met een mix van endothele groeifactoren (in aanvulling met endotheel groeimeidium voor humane endotheel celculturen) de percentages van *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen in de celkweek verhoogt.

Collageen type-I als substraat verhoogde ook de percentages van de mogelijke endotheelcellen in de celkweek; dit effect was echter niet significant in vergelijking met het ongecoatte polystyreen substraat. Ook de recombinante zebravis VEGF verhoogde de percentages van *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen indien toegevoegd aan het kweekmedium. Met

al deze optimalisatie stappen konden we de *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen voor een langere duur (tot acht dagen) kweken.

In **Hoofdstuk 5** hebben we gebruik gemaakt van de mogelijkheden van een suspensie cultuur van zebravis blastocyst cellen om het effect daarvan op de ontwikkeling van *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen in cultuur te onderzoeken. De blastocyst cellen werden gekweekt in hangende druppels op de binnenkant van de deksel van een petrischaal in het zebravis endotheel differentiatie-medium (geoptimaliseerd in de experimenten zoals die zijn beschreven in voorgaande hoofdstukken). De resultaten waren veelbelovend: we vonden significant hogere percentages *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen in de EB aggregaten van de in een hangende druppel opgegroeide blastocyst cellen vergeleken met de gehechte culturen. Wanneer de celculturen uit de hangende druppel worden overgebracht op een 2D-ondergrond dalen de percentages van *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen in de EB culturen met de tijd.

Onder optimale omstandigheden kunnen de *fli:GFP⁺* cellen worden waargenomen in de primaire EB celculturen en in secundaire kweken tot en met de tweede doorkweek. De *kdrl:GFP⁺* cellen konden daarentegen slechts worden waargenomen tot 12 dagen in de primaire celculturen. De verschillende onderzochte substraten resulteerden in variaties in de ontwikkeling van *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen. Gedurende de eerste zes dagen van de EB gehechte culturen, bedekten de *fli:GFP⁺* cellen, die migreren in een enkele laag rond de EBS, beduidend meer oppervlakte op fibrine substraat ten opzichte van het type-I collageen- en gelatine substraat.

Op een vergelijkbare manier ontwikkelden de *kdrl:GFP⁺* cellen significant langere strengen van aan elkaar verbonden *kdrl:GFP⁺* cellen, die zo een netwerk-achtige structuur vormden, op mixed collageen type-I en Geltrex™ substraat in vergelijking met pure substraten. Deze resultaten suggereren dat een complex substraat, waarvan fibrine een essentieel onderdeel is, een vereiste is voor de ontwikkeling van endotheel-achtige cellen in de zebravis blastocyst celkweek.

In **Hoofdstuk 6** toonden we de ontwikkeling van vasculaire netwerkachtige structuren in zebravis EB celculturen in een 3D gelmatrix, bestaande uit een mengsel van collageen type I, Geltrex™ en fibrine. We vonden dat in de microfluidische cultuur *kdrl:GFP⁺* cellen in de EBs langere vertakkingen vormden en deze takken werden gedurende een langere periode onderhouden in vergelijking met de statische celkweken. Daarnaast hebben we het ontstaan van *kdrl:GFP⁺* cellen uit embryonale lever en hart explantatie culturen van zebravissen waargenomen in 3D matrices. We vonden dat de *kdrl:GFP⁺* cellen in de gedissocieerde levercelkweken ook vasculaire netwerkachtige structuren vormen op 2D collageen type-I + Geltrex™ + fibrine substraat. Deze modellen zijn van mogelijk belang voor het testen van potentiële geneesmiddelen op hun effect op vasculaire ontwikkeling.

Conclusies

- Zebnavissen zijn een veelbelovend aanvullend model voor het bestuderen van de ontwikkeling van bloedvaten *in vivo* en *in vitro* (Hoofdstuk 2).
- De blastocyst celkweek kan in stand gehouden worden zonder een voedende cellaag, in LDF medium ge complementeerd met 15% FBS en 60 µg/mL ZEE (Hoofdstuk 3).
- Onder standaard groeicondities kunnen *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen *in vitro* waargenomen worden vanaf dag 1 tot dag 4 (Hoofdstuk 3)
- De groei van *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen in een zebra blastocyst celkweek kunnen gestimuleerd worden door het manipuleren van de kweekcondities (Hoofdstuk 4).
- De ontwikkeling van EBs in een hangende kweek zorgt voor betere controle over de aanmaak en ontwikkeling van *fli:GFP⁺* en *kdrl:GFP⁺* cellen in een blastocyst celkweek (Hoofdstuk 5)
- *Kdrl:GFP⁺* cellen vertonen eigenschappen van endotheel cellen door het maken van netwerk-achtige structuren. *Fli:GFP⁺* cellen daarentegen vertonen fibroblast-achtige eigenschappen door in een cellaag rondom de EBs te groeien (Hoofdstuk 5).
- Het kweken in een 3D matrix faciliteert de uitgroei van *kdrl:GFP⁺* vasculaire strengen die ontstaan vanuit de EBs (Hoofdstuk 6).
- De EBs die gegroeid worden in een 3D matrix in een microfluidisch kweek systeem, ontwikkelen langere en bredere vasculaire strengen van *kdrl:GFP⁺* cellen in vergelijking met statische kweek, wat duidt op een effect van de microfluidische stroom op vaatontwikkeling (Hoofdstuk 6)
- De EBs en orgaan explantatie modellen zoals ontwikkeld in deze studie laten zien dat het uitgroeien van vaatstructuren ontwikkeld zou kunnen worden als screening platform voor verschillende chemische stoffen en potentiële medicijnen (Hoofdstuk 6).

Toekomstperspectief

Het zebra vis embryo is momenteel in opkomst als een veelbelovend model voor het bestuderen van (bloed)vat ontwikkeling. Veel onderzoek is gedaan om transgene lijnen te ontwikkelen voor deze soort, en de ontwikkeling van zijn bloedvaten *in vivo* te bestuderen.

De grootte van de zebrafish en de relatief simpele behuizingscondities maken dit model zeer interessant voor studies in ontwikkelingsbiologie ondanks dat het nog een relatief nieuw model is. Door zijn vele voordelen (zoals hoge vruchtbaarheid en externe bevruchting) en specifieke voordelen voor celkweek toepassingen (zoals simpele kweekcondities en grote aantallen primaire cellen om te kweken), kan de zebrafish ontwikkeld worden als een veelbelovend *in vitro* model voor verschillende onderzoeksgebieden.

De beschikbaarheid van transgene lijnen maakt het mogelijk om fluorescent geactiveerde cel sortering (FACS) uit te voeren op levende endotheelcellen. Deze gesorteerde cellen kunnen vervolgens verder ontwikkeld worden tot cellijnen voor *in vitro* studies van bloedvatontwikkeling. Echter, de kweekcondities voor de differentiatie en groei van zebrafish endotheelcellen moet nog verder geoptimaliseerd worden. In principe zouden de zebrafish celkweek systemen beschreven in deze studie met FACS gesorteerd kunnen worden om alleen de endotheel cellen te isoleren en analyseren.

Een experiment dat op dit moment uitgevoerd zou kunnen worden, met de in deze studie beschreven zebrafish EB culturen, is het bestuderen van effecten van verschillende chemische stoffen waarvan bekend is dat ze een remmend of stimulerend effect hebben op bloedvatontwikkeling in *in vitro* zoogdier celcultuur modellen. Dit zou de potentie van dit model bevestigen voor het gebruik als screening platform in de toekomst. Een ander voordeel van de zebrafish is de mogelijkheid van het gebruik van mutanten voor het ontwikkelen van een *in vitro* vasculair netwerk. Dit zou kunnen bijdragen aan het ontrafelen van de moleculaire processen die een rol spelen in de vasculaire ontwikkeling.

Microfluidische culturen die de fysiologisch dynamische omgeving van weefsel nabootsen dragen bij aan het veld van bloedvatvorming. De ontwikkeling van een microfluidisch systeem verbonden aan een weefsel met vaatstructuren zou een interessant onderzoeksgebied zijn voor de toekomst. De voornaamste uitdaging bij het ontwikkelen van een dergelijk systeem zouden liggen in de mogelijkheid om 'vaatstructuur' aan 'hardware' te verbinden en dit aan te passen aan de toenemende benodigdheden van het groeiende weefsel over de tijd.