



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Squaramide-based supramolecular materials for 3D cell culture applications

Tong, C.

Citation

Tong, C. (2021, March 10). *Squaramide-based supramolecular materials for 3D cell culture applications*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3151624>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3151624>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3151624> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Tong, C.

Title: Squaramide-based supramolecular materials for 3D cell culture applications

Issue Date: 2021-03-10

Samenvatting

In de afgelopen decennia zijn synthetische hydrogelen ontwikkeld en bestudeerd als materialen die de micro-omgeving van cellen nabootsen en dit onderzoeksveld wordt “tissue engineering” genoemd. Vanwege de dynamische eigenschappen van niet-covalente interacties, zijn supramoleculaire hydrogelen met hun unieke, reversibele eigenschappen bijzonder interessant voor tissue engineering. Bovendien kunnen supramoleculaire hydrogelen de hiërarchische en structuurkenmerken van de extracellulaire matrix (ECM) *in vivo* nabootsen, door gebruik te maken van nieuwe monomeren of door het zelfassemblageproces te variëren. Hoewel talloze op peptiden gebaseerde supramoleculaire hydrogelen beschreven zijn als slimme biomaterialen voor celkweek in 3 dimensies (3D), is er nog steeds ruimte voor de ontwikkeling van nieuwe moleculaire gelatoren die eenvoudig te synthetiseren zijn tegen lage kosten.

Een van de grootste uitdagingen voor het ontwikkelen van nieuwe supramoleculaire (hydrogel) materialen is hun relatief zwakke mechanische sterkte en stijfheid, die het nabootsen van biologische materialen, zoals weefsel, beperkt. Daarom blijft het een inspirerende uitdaging in dit onderzoeksveld om de eigenschappen van synthetische materialen te verbeteren en daarmee de dynamische kenmerken van natuurlijke weefsels te repliceren en complexe biologische processen aan te kunnen sturen. In dit proefschrift is de ontwikkeling van squaramide gebaseerde supramoleculaire hydrogelen beschreven en onderzocht ik hoe deze materialen de micro-omgeving van cellen na kunnen bootsen. Bovendien kunnen deze hydrogelen gemodificeerd worden met signaalmoleculen (bv. RGD-peptide voor celadhesie), door deze covalent te conjugereren aan de monomeren voordat het polymeernetwerk wordt gevormd, of door middel van specifieke modificatie van de materialen onder invloed van UV-straling. De ontwikkelde monomeren kunnen ook worden uitgerust met foto-actieveerbare groepen om de mechanische stijfheid van de hydrogelen te controleren en hierdoor het gedrag van cellen in deze 3D-hydrogelen te optimaliseren. De introductie van een nieuwe type foto-geïnduceerde polymeer hydrogel in het supramoleculaire hydrogelnetwerk resulteerde in de vorming van een dubbel-netwerk hydrogel met verbeterde mechanische stijfheid en sterkte. Initiële studies van deze materialen in 3D-celkweek werden uitgevoerd en beschreven in dit proefschrift.

In hoofdstuk 2 werd een nieuwe zelf-geassembleerde supramoleculaire hydrogel met een flexibele TREN-kern en drie squaramide-synthons, met zowel hydrofobe en hydrofiele domeinen, ontwikkeld en onderzocht. Gelvorming onder fysiologische omstandigheden en de zelfherstellende eigenschappen werden onderzocht met rheologie studies. Cryo-TEM analyse toonde aan dat het hydrogelnetwerk bestaat uit verstrengelde fibrillen van enkele nanometers breed en micrometers lang. De vorming van eendimensionale nanovezels met een hoge aspectverhouding met 1 monomeer/nm langs de fibrillaire as werd bevestigd met behulp van SAXS-metingen. Een dieper inzicht in het zelfassemblageproces op moleculaire schaal werd verkregen met spectroscopische metingen (UV-Vis, fluorescentie en FTIR) die het belang van hydrofobe interacties en waterstofbruggen voor supramoleculaire hydrogelvorming aantoonde. De cytocompatibele respons van verschillende celtypen werd bestudeerd om de toepasbaarheid van deze hydrogelen voor 3D-celkweek te valideren. Deze studie laat zien dat het squaramide-motief kan worden gebruikt om op een efficiënte, economische en biocompatibele manier nieuwe supramoleculaire hydrogelmaterialen te ontwerpen die de natuurlijke micro-omgeving van de cel na kunnen bootsen. Bovendien kunnen de gebruikte monomeren gemakkelijk gemodificeerd worden met bioactieve signaalmoleculen (bv. RGD) om de materiaaleigenschappen te verbeteren en hun toepasbaarheid voor tissue engineering te vergroten.

In Hoofdstuk 3, werden de mechanische eigenschappen van covalente polymeer-gebaseerde hydrogelen gevarieerd door het supramoleculaire monomeer uit hoofdstuk 2 te functionaliseren met licht-reactief 1,2-dithioaan (DT). Een supramoleculaire hydrogel werd verkregen door het mengen van de monomeren met en zonder 1,2-Dithiolane (DT)-eenheden. De mechanische stijfheid van de hydrogel (10 Pa tot 10 kPa) bleek afhankelijk te zijn van de DT concentratie en de gebruikte lichtbron (bestralingstijd en lichtintensiteit). UV-bestraling veranderde de morfologie van de fibrillen niet, zoals werd bevestigd door cryo-TEM- en SAXS-analyse. Bioactieve signaalmoleculen (RGD-peptide) werden in het hydrogelnetwerk geïntroduceerd door het mengen van peptide-gemodificeerde met de DT-gemodificeerde monomeren. UV-straling bleek geen negatieve invloed op de levensvatbaarheid van de geteste cellen (NIH 3T3, C2C12 en Hs578T) te hebben. Het verschil in C2C12-morfologie en Hs578T-celmigratie in een hydrogel veroorzaakt door UV-lichtbestraling, duidde op de mogelijkheid om de micro-omgeving van cellen te controleren. Deze studie toonde de potentie aan

van 1,2-dithiolane-gemodificeerde monomeren om hiermee dynamische crosslinks in supramoleculaire polymeermaterialen te introduceren. Hiermee wordt het mogelijk om hydrogelen te creëren die spatio-temporeel kunnen worden gemodificeerd, waardoor complexe ECM-processen kunnen worden nagebootst.

Een beter begrip van de veranderingen in mechanische stijfheid voor en na UV-bestraling op moleculair niveau is nog steeds vereist en kan verkregen worden door bijvoorbeeld solid-state NMR-studies. Echter één van de uitdagingen bij het begrijpen van de zelfassemblage is de beperkte concentratie van het op 1,2-dithiolaan gebaseerde monomeer (<10 mol% van de totale concentratie) die wordt gebruikt in de geteste hydrogelen.

Daarom werd in hoofdstuk 4 1,2-dithiolaan (DT) gebruikt om een PEG-polymeer te modificeren waarbij terminale thiolgroepen reageren met norborneen (NB) gemodificeerde PEG-polymeren onder invloed van licht in aanwezigheid van een foto-initiator. Dit resulteerde in een nieuw type hydrogel. Oscillerende rheologie studies toonden aan dat de mechanische hydrogelstijfheid afhankelijk is van de totale monomeer- of fotoinitiatorconcentratie, de molaire verhouding DT/NB en de gebruikte lichtbron (bestralingstijd en lichtintensiteit). Additionele NMR-studies lieten zien dat de DT-groep na reactie leidt tot een vertakte crosslinker die efficiënt reageert met zichzelf en NB-groepen resulterend in een irreversibel gecrosslinkte hydrogel. Door het gebruik van een 2D-fotomasker of door direct laserschrijven in 3D werden RGD-peptides spatiotemporeel geïntroduceerd in het hydrogelnetwerk. Cytocompatibiliteit van de hydrogel werd aangetoond door de levensvatbaarheid van NIH 3T3-cellen na encapsulatie in het 3D netwerk te bestuderen. *In vitro* 3D-celkweek experimenten zijn een eerste stap voor vervolgonderzoeken. Een volgende stap kan zijn om het celgedrag door middel van foto-activering ruimtelijk of temporeel te koppelen aan de mechanische stijfheid of de aanwezigheid van RGD-peptiden. Bovendien, de invloed van dynamische crosslinks op celgedrag dient onderzocht te worden. Daarom is het van belang eigenschappen zoals visco-elasticiteit en stressrelaxatie van de hydrogelen beter te begrijpen.

In hoofdstuk 5 werd de fabricage van een nieuw type supramoleculaire en covalent-polymere dubbel-netwerk hydrogel onderzocht. In deze studie werden de supramoleculaire hydrogelen (hoofdstuk 3) gecombineerd met de polymeer hydrogelen (hoofdstuk 4). Door de geïntroduceerde 1,2-dithiolaan (DT) groepen werden extra covalente verbindingen tussen de twee netwerken gevormd. Oscillerende reologie studies toonde aan dat de mechanische stijfheid en

compressie-eigenschappen afhankelijk zijn van de totale supramoleculaire concentratie, het molaire percentage supramoleculaire monomeer met DT, de totale polymeerconcentratie en compositie. Bovendien werd in een rheologisch step-strain-experiment het zelfherstellende karakter van het netwerk aangetoond vanwege de combinatie van fysieke en dynamische disulfide-crosslinks. SEM-analyse werd gebruikt om de microscopische structuren van de dubbele-netwerk hydrogel te visualiseren, welke consistent waren met de rheologie studies. Andere parameters van het dubbel-netwerk hydrogel, zoals het evenwichtswatergehalte (EWC) en de zwelratio werden ook bepaald. NIH 3T3-cellen en primaire chondrocyten bleken levensvatbaar te zijn in de dubbele-netwerk hydrogelen. Daarnaast kan de matrix die tijdens de 3D-celkweek uit de primaire chondrocyten wordt geproduceerd, beïnvloed worden door de RGD-concentratie en hydrogelstijfheid te variëren. De combinatie van supramoleculaire en covalente polymeerhydrogelen resulteerde in een nieuw materiaal met unieke eigenschappen voor het dubbel netwerk, bijvoorbeeld het unieke visco-elastisch en zelfherstellend gedrag en de verbeterde mechanische stijfheid en sterkte. Daarom hebben deze hybride materialen potentie in tissue engineering om te dienen als matrix voor de groei van kraakbeen.

In de toekomst zou de toepassing van dynamisch mechanische belasting op dubbele-netwerk hydrogelen met chondrocyten interessant zijn om verder te bestuderen. Vanwege het visco-elastische en zelfherstellende karakter van de supramoleculaire hydrogel, kan de toepassing in 3D-extrusie bioprinten worden onderzocht. UV-uitdaging van de hydrogel zou het behoud van de structurele integriteit na het printen mogelijk maken door vorming van het dubbele polymeernetwerk. Hoewel nog veel parameters, zoals print-instellingen, hydrogel-samenstellingen en concentratie, celtype en celdichtheid geoptimaliseerd moeten worden om de levensvatbaarheid van de cellen tijdens het printproces te verbeteren, kan de strategie die in dit proefschrift beschreven is, als basis dienen voor de verdere ontwikkeling van nieuwe materialen om in 3 dimensies organen te creëren.