



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Dynamic polymer hydrogels as synthetic extracellular matrices for 3D cell culture

Liu, T.

Citation

Liu, T. (2021, October 26). *Dynamic polymer hydrogels as synthetic extracellular matrices for 3D cell culture*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3223084>

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/1887/3223084>

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

Samenvatting

In vitro celweek modellen zijn essentieel gebleken in het biomedische onderzoeksveld, als hulpmiddelen voorafgaand aan *in vivo* onderzoek, bijvoorbeeld in het screenen van nieuwe geneesmiddelen, het testen van toxiciteit, het onderzoeken van cellulaire mechanismen in ziektes en het vervaardigen van mini-orgaanmodellen. Een grote uitdaging in dit veld is het *in vitro* nabootsen van de micro-omgeving van de cellen *in vivo*. Voor deze toepassing zijn synthetische hydrogelen die fysische en biochemische signalen van de natuurlijke extracellulaire matrix (ECM) imiteren aantrekkelijk, echter is in veel gevallen het fenotype van de cellen *in vivo* nog niet bereikt in een synthetische matrix. In dit proefschrift is de ontwikkeling van gedefinieerde supramoleculaire en covalente hydrogelen en hun aanpassing met bioactieve peptide of eiwitten, dynamische of poreuze eigenschappen beschreven. Met deze materialen werd onderzocht hoe het aanpassen van een polymeer met verscheidene biofysische eigenschappen het celgedrag kan beïnvloeden. Door het ontwerpen van een azide-alkyn aanklikbare op squaramide-gebaseerde monomeer, zijn peptiden voor celadhesie op een efficiënte manier geïntroduceerd in een supramoleculair systeem, door het samenvoegen van verschillende monomeren om de materialen met de benodigde peptidenconcentraties te bereiden (**hoofdstuk 2**). Deze flexibele koppelingsstrategie is verder onderzocht om specifieke peptiden aan supramoleculaire monomeren te koppelen, om op lever (HepG2) en op pluripotente stamcel gebaseerde sferoiden van interacties met de omliggende matrix te voorzien (**hoofdstuk 2 en 3**). Ook is een dynamisch covalent hydrogel-systeem ontworpen, gebaseerd op thiosulfinaat disulfide bindingen, voor het ondersteunen van *in vitro* differentiatie van geïnduceerde pluripotente stamcellen tot cardiomyocyten. Parallele oriëntatie van de cellen in de dynamisch covalente hydrogel was alleen te zien in gels met een bepaalde stijfheid en

werd niet geobserveerd in statische hydrogelen, wat het belang van dynamische eigenschappen in biomaterialen benadrukt (**hoofdstuk 4**). Tot slot werden gasvormende materialen op basis van Inverse Electron-demand Diels-Alder (IEDDA) reacties onderzocht, die het mogelijk maken porositeit in de hydrogelen te controleren (**hoofdstuk 5**). Samenvattend, dynamische supramoleculaire en covalente biomaterialen, gebaseerd op verschillende chemische strategieën, werden ontworpen om de biofysische eigenschappen van de materialen te controleren voor celkweek. Deze materialen kunnen als basis dienen voor het ontwerpen van toekomstige biomaterialen op het gebied van *in vitro* 3-dimensionale celkweek.

In hoofdstuk twee is een bioactieve supramoleculaire hydrogel ontworpen die de formatie, proliferatie en groei van HepG2 sferoïden ondersteunt. En lever specifieke markers werden gemeten. Het monomeer bestaat uit een azide gefunctionaliseerde squaramide die ge-‘clicked’ kan worden aan een alkyn gemodificeerd RGD peptide met behulp van een CuAAC gekatalyseerd reactie. Supramoleculaire co-assemblage van squaramide monomeren in hun native vorm resulteerde in een bioactieve hydrogel met controleerbare concentraties peptide. De hydrogel was mechanisch zacht en bezit zelfhelende eigenschappen zoals aangetoond mer rheologische metingen. Wanneer NIH3T3 cellen in de hydrogel geplaatst worden kunnen ze RGD peptiden herkennen en identificeren, wat leidt tot verspreiding, vertakking en migratie. Vervolgens is er – naast een compacte levensvatbare en proliferatieve assemblage – aan de hand van verhoogde genexpressie van metabolische enzymen en hepatische markers aangetoond dat de bioactieve hydrogels functionele groei van HepG2 cellen ondersteunen in vergelijking tot de gebruikelijke Matrigel matrix. Deze studie toont aan dat supramoleculaire co-assemblage van squaramide monomeren een efficiënte manier is om bioactieve hydrogels te ontwerpen. En om op een simpele en controleerbare manier gebruikt te worden voor biomedische applicaties waarin één of meerdere bioactieve signalen een vereist zijn.

In **Hoofdstuk 3** werd een multicomponent supramoleculaire hydrogel beschreven die is opgebouwd uit squaramide monomeren met twee integrin-bindende peptiden. Deze hydrogel werd vervolgens gebruikt om humane geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSC) te kweken in 3D. Een vergelijkbare supramoleculaire co-assemblage tactiek zoals beschreven in Hoofdstuk 2 werd toegepast, met de uitzondering dat in deze studie drie monomeren co-assembleren. De aanwezigheid van de integrin-bindende peptiden $\alpha v \beta 5$ en RGD in de supramoleculaire hydrogel resulteerde in een mechanisch zwakker materiaal met zelf-herstellende eigenschappen. De combinatie van de peptiden AB en RGD stimuleerden de groei van hiPSCs, en bovendien konden de cellen zowel als individuele cellen of als kleine cel clusters in de gel gezaaid worden waarbij een hoge cel vitaliteit, proliferatie en behoud van de pluripotente eigenschappen werd waargenomen. Tevens kon door de introductie van de twee integrin-bindende peptiden in het materiaal een vergelijkbare celexpansie bereikt worden zonder dat aanwezigheid van een ROCK remmer noodzakelijk was. Dit hoofdstuk toont aan dat multicomponent, supramoleculaire co-assemblage systemen succesvol ontworpen kunnen worden op een flexibele manier, afhankelijk van de vereiste biologische doelstellingen. Hierdoor kan de toepassing van deze biomaterialen verder worden uitgebreid. De introductie van een azide groep in de squaramide monomeren maakt verdere chemische crosslinking strategieën mogelijk om een matrix te ontwikkelen die gebruikt kan worden in een 3D bioreactor systeem voor het kweken van hiPSCs.

In **Hoofdstuk 4** werd het ontwerp en de fabricage van een dynamische, visco-elastische hydrogel voor de differentiatie van hESC-afgeleide cardiomyocyten beschreven. Hierbij werd een nieuwe crosslinking groep geïntroduceerd die is gebaseerd op cyclische thiosulfaten. Deze cyclische thiosulfinaat groep werd geconjugeerd aan covalente, vierarmige PEG polymeren (PEG-4ODT). Echter, door een gebrek aan stabiliteit van de disulfide-gebonden netwerken moest een gecombineerde strategie toegepast worden waarbij zowel dynamische als permanente bindingen gevormd werden. Hiertoe

werden PEG-4VS en PEG-4SH polymeren aan het systeem toegevoegd omdat deze polymeren zowel disulfide als thioleen verbindingen kunnen vormen. Reologische metingen toonden de snelle vorming van een gel en de visco-elastische en zelfherstellende eigenschappen van de gevormde hydrogel. Dynamische hydrogels (25%_dPEG), bestaande uit 25% dynamische crosslinks en 75% statische crosslinks, waren stabiel in de aanwezigheid van PBS en celkweek medium, zoals aangetoond met zwellingsratio experimenten. Deze hoge mate van stabiliteit onder celkweek condities maakt het mogelijk om 25%_dPEG hydrogel te gebruiken als een synthetische matrix voor cel experimenten. Zo vertoonden hESC-CMs die werden geëncapsuleerd in deze dynamische hydrogel een gestrekte cel morfologie, een snel herstel van celcontractie en cel uitlijning, waardoor duidelijk werd dat het kweken van cardiomyocyten de voorkeur heeft aan een zachte en dynamische matrix als cellulair microomgeving. Bovendien bewees de significante toename in expressie van de cardische genen cTnT en MYH6 de potentie van deze dynamische hydrogel als kweekstelsel voor cardiomyocyt maturatie in 3D. In vervolgonderzoek kunnen meer complexe weefsels nabootst worden door het gebruik van deze dynamische hydrogel. Door bijvoorbeeld een co-cultuur te vormen van zowel cardiomyocyten als cardische fibroblasten en/of endotheel cellen in deze dynamische hydrogel, kan een betere nabootsing van in vivo hart weefsel bereikt worden.

Hoofdstuk 5 verkent de IEDDA bio-conjugatiereactie op polymeermateriaal, om zo porositeit in te bouwen in het materiaal. De IEDDA-reactie tussen tetrazine en norborneen op een multi-arm PEG-polymeer is onderzocht om elastische hydrogelen te maken. De vorming van stikstof gas in de polymerisatie reactie creëert bubbels van macroformaat. Tetrazine en norborneen werden gebruikt voor deze reactie, vanwege hun gunstige reactiekinetiek. De reactiekinetiek waren verder geoptimaliseerd door elektrondonerende en elektronzuigende groepen op de 3- en 6-positie van tetrazine te introduceren. Een snelle reactiekinetiek en een hogere concentratie van PEG-polymeer

resulteerde in een snellere gelering en kleinere poriegrootte (Bijvoorbeeld TZ3, poriegrootte = 170-360 μm). De PEG hydrogelen gemaakt via de IEDDA-reactie kunnen worden bereid met opslagmodule van 0.7 kPa tot 12 kPa, en zijn stabiel in de aanwezigheid van PBS-buffer en celcultuurmedium. Bovendien vertonen primaire chondrocyten een hoge levensvatbaarheid wanneer ze zijn ingekapseld in een zachte IEDDA-gebaseerde hydrogel. Ook produceren deze cellen kraakbeenmatrix, waarmee de potentie voor kraakbeenweefselkweektoepassingen wordt aangetoond. In de toekomst kunnen dynamische crosslinkstrategieën worden geïntroduceerd in deze moduleerbare poreuze hydrogelen, vanwege het gebruik van interpenetrerende of supramoleculaire polymeermaterialen. Hierdoor kunnen iPN of dubbelnetwerkhydrogelen worden gemaakt. Met deze hydrogelen kan een mechanisch robuuste en dynamische micro-omgeving voor cellen worden gecreëerd die beter de biofysische aspecten nabootst op verschillende lengteschalen.