



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Towards a mechanistic understanding of nanoparticle behavior using zebrafish

Arias Alpizar, G.

Citation

Arias Alpizar, G. (2021, November 4). *Towards a mechanistic understanding of nanoparticle behavior using zebrafish*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3239024>

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/1887/3239024>

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

Samenvatting

De klinische toepassing van doelgerichte, efficiënte nanosystemen voor geneesmiddeltoediening is een grote uitdaging. Een belangrijke oorzaak hiervan is onvoldoende kennis van de mechanismen die de circulatie en opname van nanodeeltjes beïnvloeden en de identificatie van de relevante moleculaire componenten. Voor een beter begrip van dit complexe probleem is een *in vivo* evaluatie strikt vereist. Het werk beschreven in dit proefschrift draagt bij tot een gedetailleerd begrip van het gedrag van lipide-gebaseerde nanodeeltjes *in vivo*. Hiertoe werd de zebrafish als een *in vivo* pre-screening model van nanodeeltjes gebruikt, door de biodistributie te bestuderen en specifieke interacties op cellulair niveau te ontrafelen. Als belangrijkste strategie werden fluorescent gelabelde nanodeeltjes geïnjecteerd in zebrafishembryo's en gevisualiseerd door middel van confocale microscopie om de intraveneus toegediende nanodeeltjes te volgen. Deze benadering maakt het mogelijk het fundamentele gedrag van nanodeeltjes te onderzoeken, de fysisch-chemische eigenschappen van de geformuleerde lipide-gebaseerde nanodeeltjes te correleren met hun biodistributie en belangrijke nano-bio interacties te identificeren. Transgene lijnen van zebrafish die fluorescente eiwitten tot expressie brengen in verschillende celtypen werden gebruikt om specifieke interacties te bestuderen. Daarnaast hebben we genetisch gemodificeerde zebrafish gecreëerd met CRISPR/Cas9. Deze technieken tonen niet alleen de belangrijkste mechanistische eigenschappen van nanodeeltjes in circulatie, maar bevorderen ook het rationele ontwerp van efficiëntere nanodeeltjes-systemen, met een voorkeur voor specifieke celtypen *in vivo*.

Hoofdstuk 1 introduceert het gebied van de nanogeneeskunde, beschrijft het ontwerp en de eigenschappen van de lipide-gebaseerde nanodeeltjes en geeft een lijst van de klinisch goedgekeurde (*i.v.*) lipide-gebaseerde geneesmiddelafgifte-systemen. Uit dit overzicht blijkt de behoefte aan *in vivo* modellen ter ondersteuning van de selectie van geschikte toedieningsnanotechnologieën en ter verbetering van de succeskans bij de klinische vertaling van nanomedicijnen. Om dit doel te bereiken is inzicht nodig in het traject van de nanodeeltjes en de bijbehorende nano-bio interacties om het gewenste doel te bereiken. In dit hoofdstuk worden de fysiologische barrières beschreven waarmee nanodeeltjes in circulatie te maken krijgen (interactie met immuuncellen, klaring van deeltjes, *etc.*). Daarnaast wordt het zebrafishmodel voorgesteld om de reis van nanodeeltjes *in vivo* te visualiseren en te onderzoeken. **Hoofdstuk 1** belicht belangrijke eigenschappen van de zebrafish, zoals optische transparantie en het gemak van

genetische manipulatie, waardoor ze een aantrekkelijk model zijn voor de ontwikkeling van efficiëntere nanomedicijnen.

In **Hoofdstuk 2** wordt de embryonale zebravis gebruikt als een model om nanodeeltjes te bestuderen. De combinatie van de doorzichtigheid van dit diermodel met fluorescent gelabelde nanodeeltjes die geobserveerd kunnen worden met confocale microscopie onthulde fundamentele aspecten in het gedrag van een breed scala van geteste nanodeeltjes. In dit hoofdstuk werden biodistributiestudies en identificatie van cellulaire interacties met nanodeeltjes geanalyseerd in de staartregio van de zebravis. Belangrijk is dat in deze regio een deel populatie van de bloedvatcellen (endotheel) homologie vertoont met het sinusoidale endotheel van de lever bij zoogdieren. Dit werd bevestigd door de geconserveerde opname van geoxideerd LDL, lithiumkarmijn, DOPG-liposomen en fluorescerend hyaluronzuur, waardoor translatie naar muizen bewezen werd. Deze studie maakte de identificatie mogelijk van de Stabiline-2 receptor die verantwoordelijk is voor de opname van voornamelijk anionische nanodeeltjes. Stabiline-2 is een zogenaamde 'scavenger' receptor die macromoleculen, bacteriën en andere liganden herkent en verwijdert uit de circulatie. Zoals aangetoond in dit hoofdstuk, is de Stabiline-2-nanodeeltje interactie van bijzonder belang voor nanogeneeskunde, omdat het ofwel geblokkeerd kan worden door remmers (*b.v.* dextran sulfaat) die de circulatielevensduur van nanopartikels verlengen, ofwel benut kan worden om een specifiek lever celtype (*b.v.* lever sinusoidale endotheliale cellen, LSECs) te targeten.

In **Hoofdstuk 3** werden andere scavenger receptoren, die tot expressie komen in het leverendotheel van muizen en in de staart regio van het zebravisembryo, onderzocht om de opname van anionische nanodeeltjes te bestuderen. CRISPR/Cas en *in situ* hybridisatie werden toegepast om met succes een enkelvoudige *stabiline-1* mutant en een dubbele *stabiline-1* en *stabiline-2* zebravismutant te genereren en te karakteriseren. De rol van de Stabiline-1 receptor op de opname van nanodeeltjes werd bestudeerd, waarbij bleek dat de grootte van het nanodeeltje één van de belangrijkste parameters is die de differentiële opname tussen de twee Stabiline receptoren bepaalt. De Stabiline-1 receptor is verantwoordelijk voor de opname van kleine anionische nanodeeltjes (6-30 nm). Bovendien bleek uit dit onderzoek dat beide Stabiline-receptoren bijdragen aan de opname van anionische nanodeeltjes met een diameter van ~100 nm. Tenslotte werd een endogeen Stabiline ligand geïdentificeerd, het endotoxine lipopolysaccharide, welke verantwoordelijk is voor toxiciteit en immuunactivatie bij zoogdieren. Dit ligand bleek uit de circulatie te worden verwijderd door zowel Stabiline-1 als Stabiline-2.

Hoofdstuk 4 richt zich op het ontwerp en van een nanosysteem dat in staat is een lading af te leveren onder controle van een externe stimulus. Over het algemeen is dit type geneesmiddel afgifte systeem aantrekkelijk omdat het een betere controle biedt voor de afgifte van de lading. Hiervoor werden liposomen ontwikkeld die in staat zijn de oppervlaktelading *in situ* en *in vivo* te veranderen onder invloed van licht als externe trigger. Liposomen werden geformuleerd met een neutraal lipide die zorgt voor goede circulatie en een fotoactieve lipide die de oppervlaktelading verandert van bijna-neutraal naar kationisch onder invloed van een lichtpuls. Deze verandering in de oppervlakte-eigenschappen leidt tot endocytose en afgifte van de liposomale inhoud. Na biofysische karakterisering werden de liposomen intraveneus toegediend in zebrafissen. De liposomen circuleerden vrij in de bloedbaan en hadden toegang tot gevasculariseerd weefsel. Na blootstelling aan UV-licht hechtten de liposomen zich snel aan alle endotheelcellen, gevolgd door internalisatie. Dit toonde het principe van stimulus-gecontroleerde endocytose en afgifte van de lading aan. Bovendien werden dynamische en gelijktijdige interacties van de liposomen met endotheelcellen en macrofagen gevonden tijdens de verandering van de oppervlaktelading.

In **Hoofdstuk 5** werd een bij toeval gevonden liposomale formulering bestudeerd met een sterke voorkeur voor de hersenvasculatuur van zebrafissen. In dit hoofdstuk werden cryo-transmissie elektronenmicroscopie (CryoTEM) analyse en *in vivo* biodistributie studies gecombineerd om de waargenomen weefsel-specificiteit te begrijpen. Liposomen, PAP3 genaamd, samengesteld uit twee lipiden (DSPC en DOaG) accumuleerde in hersenendotheelcellen (bECs) van zebrafissen. Biofysische karakterisering van deze PAP3-liposomen met CryoTEM onthulde een ongewone 'parachute'-morfologie. Dit kan worden toegeschreven aan fasescheiding tussen DOaG en DSPC lipiden. Bovendien bleek de aanwezigheid van fasescheidingsdomeinen in de liposomen vereist om de specifieke targeting in de zebrafislarven te verkrijgen. In vervolgstudies werd aangetoond dat de herkenning en binding van PAP3 liposomen worden geremd door heparine en verminderd door de endotheliale lipase inhibitor XEN445. Deze waarnemingen suggereren dat PAP3 liposomen een endogene triglyceride lipase-gemedieerde route van plasma lipide transport en metabolisme gebruikt die voorkomt in endotheelcellen met endotheliale lipase (LIPG) expressie. In muizen werden de liposomen vooral aangetroffen in de lever en de milt, welke correleert met de hoge expressie van endotheliale lipase in deze metabolische organen.

In **Hoofdstuk 6** werd een rationeel ontworpen lipide nanodeeltje (LNP) formulering voor mRNA afgifte met voorkeur voor het lever reticuloendotheliale

systeem (RES) ontwikkeld. Om deze zogenaamde srLNPs te ontwerpen, werd één zwitterionische lipide (DSPC) in de klinisch goedgekeurde Onpattro® formulering, vervangen door het DSPG. Deze aanpassing verandert de oppervlaktelading van de LNPs, van neutraal naar anionisch, met als resultaat dat de srLNPs zich bij voorkeur bevinden in de lever-RES. Het *in vivo* gedrag van de LNP formuleringen werd vergeleken en toonde aan dat mRNA beter werd afgeleverd met srLNPs intraveneus toegediend in het embryo van de zebravis. Biodistributie studies in zebravissen toonden de selectieve expressie aan van een fluorescerend eiwit in leverceltypes met cellulaire resolutie. Deze studie toonde aan dat srLNPs zich effectief richten op scavenging endotheelcellen (SECs) gemedieerd door scavenger receptoren Stabiline-1 en Stabiline-2. Dit werd bevestigd met behulp van de eerder beschreven Stabiline double knockout (zie Hoofdstuk 3). Validatie in muizen bevestigde de biodistributie, opname, cytosolische afgifte en eiwitexpressie van srLNP in hepatische RES cellen, wat mogelijkheden opent voor de behandeling van ziekten die geassocieerd worden met RES.

Hoofdstuk 7 beschrijft een stap-voor-stap protocol voor de intraveneuze toediening van nanodeeltjes in een zebravisembryo, een techniek die gebruikt wordt in de studies van dit proefschrift. Dit hoofdstuk benadrukt het belang, de kosteneffectiviteit en de veelzijdigheid van de zebravis als *in vivo* model voor geneeskunde. In dit hoofdstuk wordt een lijst van de materialen en apparatuur nodig om de reproduceerbaarheid deze experimenten gegeven. Dit hoofdstuk behandelt liposoom formulering, en geeft een gedetailleerde beschrijving van hoe intraveneuze injectie in een zebravis embryo uit te voeren, het gebruik van licht als externe trigger, data acquisitie en analyse van nanodeeltjes in de zebravis.

In **Hoofdstuk 8** werden alle studies die in dit proefschrift zijn gepresenteerd gecombineerd in een algemene discussie en werden enkele conclusies getrokken.