



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Functional fluorescent materials and migration dynamics of neural progenitor cells

Bossert, N.

Citation

Bossert, N. (2022, January 13). *Functional fluorescent materials and migration dynamics of neural progenitor cells*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3249722>

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/1887/3249722>

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

SAMENVATTING

Microscopie is de wetenschap van het onderzoeken van objecten die te klein zijn om waar te nemen met het blote oog. Sinds microscopen populaire gebruiksvoorwerpen werden voor biologisch onderzoek in de zeventiende eeuw, hebben deze instrumenten een immense technologische revolutie ondergaan. Vooral fluorescentie microscopie heeft zijn weg gebaand in wetenschappelijk onderzoek, waaraan de ontwikkeling van een enorme hoeveelheid aan fluorescente markers en materialen gepaard ging. Gezien cellen vooral uit water bestaan en doorschijnend zijn, kunnen verschillende cellulaire structuren gevisualiseerd en onderscheiden worden door ze fluorescent te markeren. De integratie van het incubatie-platform opende het pad naar het onderzoeken van levende cellen over periodes van dagen en zelfs weken, terwijl de ontwikkeling van snel-scannende microscopen ons in staat stelde snel afbeeldingen te maken. Gecombineerd met tijdsverloop-microscopie, waarbij software zo geprogrammeerd wordt dat er automatisch afbeeldingen gemaakt worden op regelmatige tijdsintervallen over een bepaald tijdsbestek, werd het mogelijk om diepere inzichten te krijgen in de dynamica van levende cellen en hun interactie met fluorescerende materialen.

In dit proefschrift speelt tijdsverloop-microscopie een cruciale rol in het onderzoeken van functionele materialen binnenin levende cellen, en het migratie-gedrag van neuronale progenitorcellen. Het eerste gedeelte van dit proefschrift focust zich op twee verschillende (nano)materialen, en het tweede gedeelte behandelt het fluorescente labelen van neuronale progenitorcellen en cel dynamiek binnen verschillende in vitro systemen.

Fluorescente nanomaterialen presenteren zichzelf als exceptionele praktische werktuigen voor het labelen van cellen en hun organellen. Gedurende de voorgaande decennia is er veel moeite gestopt in het ontwikkelen van materialen die sterke en robuuste fluorescentie hebben, gemakkelijk worden opgenomen door cellen, en niet de cellulaire processen en de gezondheid van de cel beïnvloeden. Verder onderzoek werd er gedaan naar het ontwikkelen van functionele fluorescente materialen die niet alleen een bestaande structuur labelen, maar ook nog reageren op processen binnenin de cel en een variabiliteit in hun respons bieden. Bijvoorbeeld, een ontwikkeling in de biochemie maakt het mogelijk om een fluorescent signaal te gebruiken als spanningsensor binnenin neuronen, daarbij functionerend als een indicator voor neurale activiteit. Gepaard met deze ontwikkelingen, introduceert hoofdstuk II een fascinerend hybride materiaal bestaande uit een combinatie van DNA-moleculen en zilveren clusters, een DNA-omsloten zilveren nanocluster (Ag-DNA) genaamd. Ag-DNA vertoont unieke optische eigenschappen die afgestemd kunnen worden door middel van de DNA-sequentie en DNA-lengte, en is zeer gevoelig voor de omgevingscondities. In vorige publicaties werden deze nanomaterialen gebruikt voor het detecteren van metaalionen in vitro of om verkeerde combinaties in DNA-sequenties op te sporen. In Hoofdstuk II gebruiken we Ag-DNA in levende cellen en laten we zien hoe de selectie van het DNA-sjabloon de re-

sulterende structuren beïnvloed en Ag-DNA constructies teweegbrengt die verschillende functies uitvoeren binnenin de cel. Meer specifiek gekeken, presenteren we drie verschillende Ag-DNA constructen die verschillende fluorescerende reacties hebben wanneer deze worden opgenomen in levende cellen, inclusief karakteristieke excitatie- en emissie- verschuivingen. Verder was het mogelijk om de cytotoxiciteit van deze nanomaterialen zo af te stemmen, door de DNA-sequentie en lengte te variëren, dat deze juist biocompatibel werden en mogelijk interessant kunnen zijn voor antikanker of anti-bacteriële toepassingen.

Een andere categorie van een fluorescerend materiaal wordt geïntroduceerd in Hoofdstuk III. Dit hoofdstuk focust zich op polymersomen, dat zijn synthetische blaasjes bestaande uit een lipofiel membraam en een waterige binnenkant die geladen kan worden met verschillende moleculaire entiteiten. In onze experimenten worden polymerosomen geladen met twee verschillende fluorescerende kleurstoffen en geanalyseerd in levende kankercellen. Tijdsverloop-microscopie wordt ingezet om het internalisatieproces te analyseren en het lot van de polymerosomen in levende cellen te volgen gedurende een tijdsbestek van twee uren en 86 uren, respectievelijk. We zien dat cellen de dubbel-gelabelde nanoblaasjes snel internaliseren en deze gelijkmatig verdelen over de dochtercellen gedurende de celdeling. Ook blijft het fluorescente signaal stabiel tot drie dagen, waarmee de potentie van deze nanomaterialen voor lange-termijn biologische studies wordt aangetoond.

Het tweede gedeelte van dit proefschrift is gefocust op de multipotente stamcellen van het centrale zenuwstelsel – neurale progenitorcellen (NPCs). Hun multipotente en regeneratieve capaciteiten maken ze uitstekende kandidaten voor het behandelen van neurodegeneratieve ziekten en letsels in het centrale zenuwstelsel. Wij gebruiken de murine neurale progenitorcellijn C17.2 voor onze experimenten. In Hoofdstuk IV bevestigen we eerst de neurale progenitor status van ongedifferentieerde C17.2 door gebruik te maken van morfologische analyse en fluorescente immunolabels. Als tweede worden verschillende fluorescente kleurstoffen en genetische labels getest met als doel de nucleus en cellichaam of cytoskelet van C17.2 cellen te labelen. Als laatste wordt een virale dubbel-transductie met succes uitgevoerd waarbij een stabiele cellijn ontstaat met gelabelde nucleus en cytoskelet. Deze fluorescente C17.2 cellijn wordt gebruikt in hoofdstuk V voor de analyse van cel dynamica.

Ondanks talrijke publicaties omtrent de regeneratieve capaciteiten van neurale progenitor in ziekte- en letselstudies in dierenmodellen, ontbreekt er basiskennis over hun migratiegedrag. In Hoofdstuk V introduceren we verschillende minimalistische in vitro systemen die gebruikt worden voor het produceren van preliminaire resultaten omtrent de dynamica van neuronale progenitor cellen. We coaten substraten met extracellulaire matrix eiwitten in zowel een simpel vlak als een in een patroon, vervolgens observeren we het gedrag van C17.2 cellen in verschillende condities via fluorescente tijdsverloop-microscopie. We kijken naar de algemene statistische waarden van hun migratie op eenvoudige oppervlaktes en begrensde patronen. We berekenen de gemiddelde tijden waarin C17.2 cellen in een bepaalde richting bewegen tot wanneer ze van richting veranderen. Ook wordt hun gemiddelde snelheid en diffusiewaarden berekend op simpele oppervlaktes en op patronen waarbij lijnen zijn aangebracht met verschillende breedtes. Ook observeren we dat NPCs een persistent willekeurig bewegingsmodel volgen, waarbij

ze persistent over kortere tijdschalen zijn, maar willekeurig bewegen over langere tijdschalen. Door middel van visuele analyse hebben we inzicht gekregen in een set van terugkerend gedrag, waaronder frequente veranderingen in richting om de omgeving te verkennen en hun competitie naar ruimte, wanneer deze cellen zich in verschillende omgevingen bevinden met verschillende patronen. Deze vroegtijdige resultaten kunnen gebruikt worden voor de eerste wiskundige modellen die zich focussen op het begrijpen van hoe NPCs migreren in vivo. Alle geïntroduceerde experimentele opstellingen kunnen gebruikt worden in vervolgstudies om in een nog groter detail en complexiteit de metingen te doen, chemische sturingsgradiënten kunnen bijvoorbeeld toegevoegd worden om de in vivo situatie nauwkeuriger na te bootsen.

Het onderzoek dat beschreven wordt in dit proefschrift behelst verschillende onderwerpen die verbonden zijn door de gebruikte afbeeldingstechniek van draaischijf confocale fluorescentie microscopie en de gebruikte fluorescente materialen en markers in levende cel systemen. De gepresenteerde resultaten verschaffen nieuwe informatie in hoe de selectie van een DNA-sjabloon Ag-DNA moleculen voortbrengt met verschillende functionaliteiten in levende cellen. Het laat ook zien dat deze materialen gebruikt kunnen worden als stabiele fluorescente labels in cellen – als intracellulaire sensoren – of als werktuigen om celdood te bewerkstelligen. De observaties omtrent de duo-fluorescente polymerosomen helpen mee aan ons begrip van wat het lot is van deze nanoblaasjes op zowel korte- en lange- termijn in levende cellen, en maakt het mogelijk om ze te gebruiken als fluorescente labels in andere biologische systemen. De vastgestelde stabiele fluorescente NPCs kunnen gebruikt worden door onderzoekers voor vervolgstudies. Als laatste, de gepresenteerde minimalistische in vitro systemen en de verworven eerste inzichten in het dynamische gedrag van neurale progenitor cellen, markeren een startpunt voor verder en gedetailleerdere analyse van deze cellen die cruciaal zijn voor het ontwikkelen van toekomstige behandelingen tegen regeneratieve ziektes van het centrale zenuwstelsel.