



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Forces and symmetries in cells and tissues

Eckert, J.

Citation

Eckert, J. (2022, December 6). *Forces and symmetries in cells and tissues*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3492626>

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/1887/3492626>

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

Samenvatting

Welke eigenschap hebben walvissen, slakken, mensen, bloemen en alle andere levende wezens gemeen? We zijn allemaal opgebouwd uit dezelfde bouwstenen, cellen genaamd. Bijvoorbeeld, biljoenen cellen, variërend in grootte van tientallen microns, rangschikken zichzelf in een netwerk om organen van het menselijk lichaam en de omringende structuur te vormen. Ze doorlopen hun eigen levenscyclus, communiceren en coördineren om de kenmerken van onze individualiteit te bieden. Alleen al het feit dat je dit boek hebt kunnen openen en hopelijk genoten hebt van het lezen van dit proefschrift, is te danken aan je netwerk van cellen.

Wat is het mysterie achter dit netwerk dat ons hele leven mogelijk maakt met zulke kleine cellen? Simpel gezegd, het netwerk van cellen verschilt niet zo veel van onze gemeenschap. We hebben nog steeds de neiging om mensen te specificeren op basis van hun geslacht, land van herkomst of culturele achtergrond, ook al zijn we allemaal hetzelfde. Cellen worden onderverdeeld in verschillende celtypen, zoals stamcellen, huidcellen, spiercellen en longcellen op basis van hun moleculaire structuur en samenstelling. Mensen staan in het dagelijks leven met elkaar in contact, staan in de rij bij de supermarkt, worden geperst in de metro, steken bruggen over met anderen of genieten gewoon van een voetbalwedstrijd in een groot stadion. We hebben interactie met onze gemeenschap, maar we kunnen ook genieten van onze privacy en gescheiden blijven. Cellen doen in principe hetzelfde. Ze zijn met elkaar verbonden om kleine structuren, monolagen en weefsels zoals blaasjes en organen te bouwen. Cellen interageren ook met hun omringende micro-omgeving en migreren er individueel of in kleine kolonies doorheen, zoals het geval is bij kankermetastasen. We zien dat beleving van de omgeving, communicatie, coördinatie en collectiviteit een grote rol spelen op verschillende schalen. Dit proefschrift behandelde dergelijke onderwerpen op het gebied van celbiologie, biologische en zachte materie fysica en combineerde experimentele observaties met theoretische beschrijvingen.

Het ontstaan en de rol van interacties tussen cellen is de afgelopen decennia besproken en is nog steeds een urgent onderwerp in het dagelijkse onderzoek in verschillende onderzoeksdisciplines. Terwijl natuurkundigen

cel-cel adhesie beschrijven in termen van spanning, krachten, druk en stress op het celinterface, bestuderen biologen de moleculaire samenstelling en mechanismen in de betrokken cellen. Sommige moleculen over het membraan verbinden cellen met elkaar of de cel met de micro-omgeving, andere vormen een skeletstructuur, het cytoskelet van de cel, en weer andere combineren alle interne onderdelen. In **Hoofdstuk 1** hebben we dit onderwerp besproken en een definitie van cel-cel adhesie geïntroduceerd met een gemeenschappelijke basis voor het begrijpen van de biologische en fysische principes van cel-cel adhesie. Wanneer cellen met elkaar in contact zijn, ervaren ze druk en spanning van hun aangrenzende cellen, zoals samengeperste mensen in een metro, die bij elke bocht tegen elkaar botsen. Cellen kunnen reageren op krachten uit hun micro-omgeving en naburige cellen. Elk verschil in spanning dat wordt ervaren, begint een signaalroute in de cel. Moleculen worden gerekruteerd en herschikt door de cel om bijvoorbeeld de stabiliteit op de cel-cel adhesie-interface te ondersteunen, en ze kunnen leiden tot veranderingen in het cytoskelet, wat resulteert in vormveranderingen van cellen. Op zijn beurt staat elke actie van een cel tegenover een reactie van andere cellen. Vanuit extern oogpunt wordt cel-cel adhesie ook geassocieerd met vormveranderingen, coördinatie en collectief gedrag van cellen.

In **Hoofdstuk 2** hebben we de reactie van individuele cellen op hun micro-omgeving bestudeerd. De interne structuur van individuele cellen verschilt van die van verbonden cellen. Individuele cellen hechten zich uitsluitend aan het substraat met behulp van adhesiemoleculen. Adhesiemoleculen verbinden zich op hun beurt met het cytoskelet, dat de vorm van de cel ondersteunt. Dit cytoskelet kan samentrekken, waardoor een trekkracht op het substraat ontstaat en de hele cel kan bewegen, vergelijkbaar met de spiercontractie van een slak. De samentrekking en dus de uitgeoefende trekkracht is een kenmerk van cellen. Spiercellen genereren bijvoorbeeld hoge krachten om bloed door aderen te pompen. Hier hebben we twee verschillende celtypes vergeleken op basis van hun trekkrachten en onderzocht hoe hun vorm hieraan gerelateerd is. Om de trekkrachten van cellen te meten, gebruikten we een specifiek hulpmiddel dat de micropilaar-matrix wordt genoemd. Micropilaar-matrices bestaan uit honderden kleine elastische pilaren die veel kleiner zijn dan de grootte van een cel. Wanneer een cel zich hecht aan een bed van micropilaren en de kracht begint uit te oefenen, buigen de balken. Deze buiging kan worden gemeten met microscopen en software die de doorbuiging van de pilaar omzetten in een kracht. In ons experiment gebruikten we endotheel- en fibroblastcellen. Endotheelcellen vormen nauw verbonden tweedimensionale weefsels die bloedvaten

omringen. Fibroblasten zijn op hun beurt beweeglijk, behouden de integriteit van weefsels en zijn dus betrokken bij weefselherstel. In onze studie toonden we aan dat endotheelcellen de helft van de tractiekrachten van fibroblasten op hun omgeving uitoefenen. Dit resultaat geeft de functie van de afzonderlijke celtypen weer. Omdat de cel-cel adhesie uitgesproken is in endotheelcellen voor weefselvorming, is de samentrekking van het cytoskelet op het cel-cel interface sterker dan bij de cel-substraatadhesie. Fibroblasten vereisen sterkere cel-substraat interacties om de omgeving van de cel te hermodellieren. We toonden verder aan dat de trekkrachtverdeling van endotheelcellen breder is en correleert met hun ronde morfologie, terwijl fibroblasten meer langwerpig zijn en de trekkrachten meer gelokaliseerd. We speculeren dat de correlatie van het krachtverdelingspatroon met cellulaire morfologie zou kunnen leiden tot het sturen van de richting van celbewegingen en collectief gedrag, een inzicht dat belangrijk kan zijn voor het mechanisme van cel- en weefselmigratie.

Tijdens dynamische processen zoals collectieve celmigratie ervaren cellen snelle veranderingen van spanning op hun cel-cel interface. Cel-cel adhesies moeten worden gevormd om losrakende krachten te weerstaan en de weefselintegriteit te behouden. De vragen hierbij zijn: wat is de maximale kracht die kan worden uitgeoefend om de cel-cel adhesie te verbreken en is deze te meten? Om deze vragen te beantwoorden, hebben we de micropilaar matrix-technologie verder ontwikkeld om cel-cel loslatingskrachten nauwkeurig te meten. In **Hoofdstuk 3** presenteerden we onze nieuwe technologie, het Cell-Cell Separation Device of kortweg CC-SD. De CC-SD bestaat uit dicht bij elkaar geplaatste micropilaar-matrixblokken waaraan cellen kunnen hechten en verbinding kunnen maken over de opening. Idealiter hechten twee cellen in een doubletconfiguratie zich aan de micropilaren. Het buigen van micropilaren wordt opnieuw gebruikt voor celtractiekrachtmetingen. De uitgeoefende krachten die het celdoublet omringen, moeten in evenwicht zijn met een mechanisch evenwicht. Als je de hand van iemand anders vasthoudt, voel je allebei de spanning in je armen, terwijl je stevig op je voeten staat zonder te bewegen. Deze spanning tussen cellen kan worden gemeten met behulp van micropilaren. We toonden aan dat de cel-cel adhesiekracht in dergelijke stabiele omstandigheden evenredig is met de totale uitgeoefende trekkracht op pilaren. Om het cel-cel contact te belasten, hebben we de blokken verbonden met een dunne laag eronder. Het uitrekken van de laag scheidt de blokken en verhoogt de spanning op de cel-cel adhesie. De spanning is voornamelijk gelokaliseerd bij het cel-cel contact en minder onder de cel door de blokken die voorkomen dat de pilaarvelden vervormen. In ons voorbeeld, wanneer de afstand tot de

andere persoon voor je toeneemt, neemt ook de spanning in je armen toe. Ook voel je meer spanning in je benen en oefen je meer weerstand uit op de grond. De toename van substraatkrachten die door cellen worden uitgeoefend, kan worden gemeten door de CC-SD en geeft informatie over de verhoogde spanning tussen cellen en laat zelfs het contact verbreken. Onze nieuw ontworpen CC-SD opent mogelijkheden voor het analyseren van cel-cel losmaakkrachten en werpt licht op de robuustheid van cel-cel adhesies in dynamische processen in weefselontwikkeling.

Zoals we hebben besproken in **Hoofdstuk 1**, ondergaan cellen in weefsels dynamische processen waarin cel-substraat en cel-cel verklevingen een rol spelen. De druk en spanning van naburige cellen veroorzaken vormveranderingen van individuele cellen en veroorzaken zelfs collectieve migraties binnen een weefsel. In een dicht opeengepakte metro, als je dicht bij de deur staat, de trein stopt en de deur gaat ineens open, heb je soms geen kans om in de wagon te blijven. Je wordt gedwongen om de stroom van de andere passagiers te volgen. Het collectieve gedrag en de richting van cellen zijn de huidige stand van het onderzoek en kunnen worden gevonden in een grote verscheidenheid aan systemen zoals wondgenezing, kankermetastase en embryonale ontwikkeling. Om de collectiviteit van cellen tijdens migratie te verklaren en te bestuderen, hebben wetenschappers voornamelijk gebruik gemaakt van een zogenaamde nematische symmetrie afgeleid van vloeibare kristallen, d.w.z. staafachtige structuren, in de fysica van zachte materie. Nematics beschrijft de oriëntatie en verlenging van cellen op eencellige schaal en hun uitlijning op grote schaal. De algehele uitlijning kan worden samengevat door een enkele waarde, de nematische ordeparameter, die aangeeft in welke maten cellen collectief in een bepaalde richting uitgericht zijn. Als je echter een weefsel van dichterbij bekijkt, zul je merken dat cellen niet altijd langwerpig zijn. Cellen kunnen een afgeronde vorm hebben en met hun burens georganiseerd zijn in een zeshoekig patroon waarin de afstanden tot alle zes burens bijna gelijk zijn. Het beschrijven van deze zes voorkeursrichtingen vereist een ander soort symmetrie, namelijk hexatische symmetrie. De beschrijving van cellen in monolagen op basis van nematische en hexatische orde was het onderwerp in **Hoofdstuk 4**. Door experimentele waarnemingen te combineren met numerieke simulaties, vergeleken we de hexatische en nematische orde van celsystemen over verschillende lengteschalen. Beginnend met het eencellige niveau, hebben we aangetoond dat cellen inderdaad een dominante hexatische orde hebben op eencellige schaal. Ze zijn eerder zeshoekig-rond dan langwerpig. Toen we naar de naaste burens van de cellen keken, zagen we dat het celsysteem overschakelde van hexatische naar nematische symmetrie door steeds meer

naburige cellen te beschouwen. De resultaten toonden aan dat onze nieuwe benadering het naast elkaar bestaan van hexatische en nematische symmetrie op verschillende lengteschalen identificeerde. Het kennen van de juiste symmetrie van het systeem opent de mogelijkheden om de hiërarchische structuur van cellen in weefsels te bestuderen, hoe cellen coördineren en meercellige organisatie bereiken.

Meercellige organisatie is belangrijk in ontwikkelingsprocessen en komt voor bij uitzaaiingen van kanker. We hebben in **Hoofdstuk 2** al laten zien dat verschillende celtypen verschillende eigenschappen hebben in termen van morfologie vanwege hun trekkrachten en cel-cel adhesie. Het belangrijkste type weefsel in ons menselijk lichaam, dat alle oppervlakken bedekt, inclusief organen, zijn epitheelweefsels. Epithelia staan bekend om hun sterke cel-cel adhesie. Onder bepaalde omstandigheden kunnen epitheelcellen hun cel-cel adhesie verliezen, sterkere verklevingen aan het substraat ontwikkelen, mobiliteit krijgen en zelfs individueel worden. Dit proces wordt epitheliale-naar-mesenchymale transitie genoemd, waarbij cellen transformeren van epitheliale weefselcellen in invasieve en actieve mesenchymale cellen die betrokken zijn bij wondgenezing, fibrose en kankerprogressie. Tijdens deze processen verandert de hele meercellige organisatie. In **Hoofdstuk 4** hebben we laten zien dat de symmetrie van weefsels verschilt over verschillende lengteschalen en mogelijk verband houdt met meercellige organisatie. Hoe verandert de symmetrie wanneer cellen hun adhesie-eigenschappen en weefsels hun celdichtheid veranderen? We hebben deze vragen beantwoord in **Hoofdstuk 5** door epitheelcellen te vergelijken met mesenchymale cellen waarin, in tegenstelling tot epitheelcellen, alleen een specifiek type cel-cel adhesiemolecuul is verwijderd. Verwijdering van adhesiemoleculen leidt tot sterke vorming van het cytoskelet om cellulaire stabiliteit door het substraat te verkrijgen. Om ons voorbeeld van hierboven aan te halen, als je in de volle metro zit, houd je het evenwicht tussen de andere passagiers. Er is geen ruimte om te vallen. Wanneer er echter minder passagiers zijn, moeten jouw benen het overnemen en jouw evenwicht coördineren. In onze experimenten hebben we aangetoond dat mesenchymaal-achtige cellen inderdaad groter en meer gespreid zijn vanwege hun sterk ontwikkelde cytoskeletnetwerk. Toen we naar de symmetrie van individuele cellen in weefsels keken, ontdekten we dat cellen, onafhankelijk van het bestaan van het bepaalde type cel-cel adhesiemolecuul, en hoe ze ook samengedrukt worden, altijd een dominante hexatische ordening hebben. Ze zijn liever zeshoekig-rondachtig dan langwerpig en nematisch. Als we opnieuw naar steeds meer naburige cellen kijken, heeft de monolaag opnieuw een hogere en dominante nematische symmetrie. Deze cross-over,

d.w.z. het aantal beschouwde cellen, van hexatisch naar nematisch hangt wel af van de cel-cel adhesie. Het verwijderen van cel-cel adhesiemoleculen veroorzaakt een dominante nematische organisatie in meercellige systemen op grote schaal. Cellen met sterke cel-cel contacten behouden hun hexatische organisatie voor iets langere lengteschalen. Dit geldt ook voor monolagen met een hogere celdichtheid. Deze resultaten geven aan dat het samenspel tussen cel-substraat en cel-cel adhesie de lengteschaal van de hexatische symmetrie regelt.

Er blijven echter veel vragen over. Is het mogelijk om visueel waarneembare kenmerken van cellen, zoals weefselsymmetrie, collectieve migratie en celvormveranderingen, te bestuderen en deze informatie te gebruiken om intercellulaire mechanismen te identificeren? Kunnen we de 'symptomen' van cellen bestuderen om de juiste 'diagnose' van verstoorde weefselorganisatie te krijgen? Kunnen we een patroon identificeren en zelfs collectief celgedrag en daarmee ontwikkelingsprocessen voorspellen?

Vragen op vragen. Als je niet bent gestopt met lezen of in slaap bent gevallen, hoop ik je ervan te hebben overtuigd dat dit proefschrift een hoofdstuk opent om deze vragen te beantwoorden. We toonden aan dat celmechanica en geometrische eigenschappen zoals cel- en weefselsymmetrie informatie verschaffen over intercellulaire processen en cel-cel interacties op moleculaire schaal. Het combineren van de knowhow van verschillende onderzoeksdisciplines is essentieel voor waterdicht onderzoek en opent mogelijkheden om alle resultaat-stukken van de onderzoekspuzzel aan elkaar te koppelen om het grote geheel te completeren.

Julia Eckert