

9. Nederlandse Samenvatting

Cellen in ons lichaam zitten niet alleen. Iedere cel is omgeven door andere cellen en een fiber netwerk genaamd de extracellulaire matrix (ECM). Dit netwerk geeft structuur en stijfheid aan het weefsel, zodat weefsels interne en externe krachten kunnen weerstaan. Cellen oefenen continu kracht uit op hun omgeving ('tractiekrachten') om er informatie over in te winnen. Mensen doen iets vergelijkbaars: We oefenen krachten uit met onze handen om te voelen hoe stijf iets is. Dat de omgeving stijf of zacht is heeft belangrijke consequenties. Een mooi voorbeeld hiervan is dat de mechanische eigenschappen alleen al kunnen bepalen in welke cel een stamcel differentieert. Hoe een cel reageert op de mechanische eigenschappen van zijn ECM omgeving wordt *mechanosensing* genoemd. Dit process wordt in detail besproken in hoofdstuk 1.

Het veld *mechanobiology* is een groeiend interdisciplinair gebied waar zowel biologen, chemici, ingenieurs en natuurkundigen aan meewerken. Tot nu toe wordt cellulaire mechanosensing vooral onderzocht met synthetische polymeer substraten, zoals polyacrylamide. Deze substraten hebben eenvoudige mechanische en chemische eigenschappen vergeleken met de ECM: Ze worden beschreven door een enkele stijfheid die niet afhangt van de kracht die erop uitgeoefend wordt. De ECM is echter heel complex: Het wordt namelijk stijver met toenemende deformatie (genaamd '*strain-stiffening*'). Dit komt deels door de hiërarchische fiber structuur. Het doel in dit proefschrift, getiteld 'Extracellulaire Matrix Mechanica en de Consequenties voor Cellulaire Mechanosensing', was om te onderzoeken waar deze bijzondere mechanische eigenschappen van twee belangrijke ECM netwerken vandaan komen: fibrine (hoofdstuk 2–5) en collageen (hoofdstuk 6 en 7). Deze twee netwerken worden vaak gebruikt als model systemen om cel-matrix interacties te bestuderen, zowel in 2D als 3D. We gebruiken macroscopische deformatie (macrorheology) om de elastische en visceuze mechanische eigenschappen te meten van de twee netwerken en vergelijken dit met theoretische modellen voor semiflexibele polymeer netwerken. We kijken ook naar het effect van cellen op de structurele en mechanische eigenschappen van deze twee netwerken.

In hoofdstuk 2 bestuderen we de mechanische eigenschappen van fibrine. Fibrine is een tijdelijk netwerk dat vormt wanneer we ons verwonden en is de eerste stap naar de vorming van een korst. Cellen gebruiken dit netwerk om naar de wond te migreren en om het verloren weefsel te herstellen. Fibrine moet voor zijn taak dus substantiele krachten kunnen weerstaan, namelijk de deformaties door de bloedstroom en deformaties door cellulaire tractiekrachten. De fibrine fibers zijn opgebouwd uit semiflexibele protofibrillen, die met elkaar

verbonden zijn door permanente bindingen (gemaakt door het enzyme FXIII). Door de polymerizatie condities te variëren hebben we netwerken gecreeëerd bestaande uit hele dunne profiberbundels. We laten zien dat de mechanische eigenschappen van deze netwerken goed beschreven worden door een entropisch netwerk model. Dit model voorspelt dat het 'strain-stiffening' gedrag komt door het uitrekken van de thermische fluctuaties in de fibers. We hebben ontdekt dat de mechanische eigenschappen van fibrine netwerken goed beschreven kunnen worden door een bundel model dat stelt dat de stijfheid van het *netwerk* afhangt van hoeveel profibrillen een fibrine *fiber* heeft en hoe sterk deze profibrillen verbonden zijn aan elkaar.

Een belangrijke consequentie van het 'strain-stiffening' gedrag van fibrine netwerken is dat cellen actief de stijfheid van hun omgeving kunnen aanpassen. Dit wordt in detail gebestudeerd in hoofdstuk 3. Wanneer cellen in een fibrine netwerk zitten, wordt het fibrine netwerk stijver door de tractiekrachten van de cellen op het netwerk. De stijfheid van zo'n netwerk bij kleine deformaties is afhankelijk van de celldichtheid, terwijl de stijfheid bij grote deformaties niet verandert vergeleken met netwerken zonder cellen. Cellen kunnen dus hun omgeving stijver maken door de krachten die ze uitoefenen, wat als weer terug gekoppeld kan worden naar mechanosensing van de cel. Met andere woorden, cellen reageren niet op de stijfheid van het netwerk die het zou hebben zonder cellen, maar op de (stijvere) modulus die het netwerk heeft door de interne tractiekrachten.

Het entropisch model dat gepresenteerd is in hoofdstuk 2 beschrijft de mechanica van fibrine netwerk goed, behalve bij grote deformaties. Een belangrijke aanname in dit model is dat de profibrillen in de fibrine fibers een constante modulus hebben, net zoals een veer een constante veerconstante heeft die niet verandert met de uitgeoefende kracht. Echter, experimenten op individuele fibrine fibers hebben aangetoond dat deze fibers stijver worden wanneer ze worden uitgerekt. Er zijn meerdere verklaringen voor dit fenomeen, waaronder het ontvouwen van fibrine monomeren in de fibers. Echter, geen enkele van deze verklaringen zijn tot nu toe direct gelinkt aan experimenten. In hoofdstuk 4 rekken we fibrine netwerken uit en kijken we naar de moleculaire lengteschalen in de fibrine fibers met small-angle X-ray scattering (SAXS). Deze SAXS spectra vergelijken we met gesimuleerde spectra van uitgerekte profibrillen, gebruikmakend van molecular dynamics simulaties. We laten zien dat ontvouwing van de γ -nodule van fibrine moleculen plaatsvindt bij een uitrekking van 30%. Dit gaat gepaard met veranderingen in de structuur van de monomeren in de fiber, waarbij de alpha-helical content in de monomeren omlaag gaat en deze worden omgezet in (stijvere) beta-sheets. Dit zorgt ervoor dat fibrine fibers erg uitrekbaar zijn en het verklaart ook waarom ze stijver worden. Dit werk laat zien dat ontvouwing van fibrine moleculen een belangrijke rol speelt voor de uitrekbaarheid van fibrine netwerken bij hoge mechanische

deformaties.

Het meeste werk dat zich richt op het bestuderen van de mechanische eigenschappen van de ECM maken gebruik van macroscopische meettechnieken, zoals extensie testen en macrorheologie. Echter, een cel in een 3D netwerk ziet niet het hele netwerk, maar juist de fibers in hun directe omgeving. Met andere woorden, cellen meten de mechanische eigenschappen om de micron schaal, in plaats van de millimeter of centimeter schaal. Om meer inzicht te krijgen in de mechanische eigenschappen op deze kleinere lengteschaal, maken we gebruik van een optisch pincet ('optical tweezer') in hoofdstuk 5, waarbij we de thermische fluctuaties van kleine deeltjes bestuderen in fibrine netwerken. Deze thermische fluctuaties geven informatie over de lokale mechanische eigenschappen over een breed frequentie bereik (1 Hz tot 20 kHz), waardoor we zowel informatie winnen over de stijfheid van het netwerk (lage frequenties) en van individuele fibrine fibers (hoge frequenties). We laten zien dat fibrine fibers zich gedragen als semiflexibele polymeren, dat consistent is met het model gepresenteerd in hoofdstuk 2. De stijfheid gemeten bij lage frequenties komt in de buurt van wat we meten met macrorheology, echter de absolute waarde is afhankelijk van de oppervlakte chemie van de deeltjes.

In hoofdstuk 6 bestuderen we collageen netwerken, en in het bijzonder collageen type I. Collageen type I is een proteïne die het meeste voorkomt in ons lichaam en daarom vaak gebruikt wordt als model systeem voor experimenten met cellen. Ondanks dat dit ECM veel gebruikt wordt, is de oorsprong van hun mechanische eigenschappen niet goed bekend. Wij bestuderen de origine van het strain-stiffening van collageen netwerken in hoofdstuk 6, waarbij de metingen van macrorheologie goed beschreven worden door een athermisch netwerk model. De netwerken die gevormd worden laten een connectiviteit zien van tussen de 3 en 4, terwijl voor een netwerk van mechanische veren een connectiviteit van 6 nodig is om stabiel te zijn. Collageen netwerken zijn desondanks stabiel bij lage krachten, vanwege de hoge modulus van de fibers bij buiging. Dus de weerstand die fibers bieden om buiging te weerstaan, zorgt ervoor dat het netwerk stabiel is. Bij hogere deformaties wordt negatieve normaal krachten opgebouwd die het netwerk stijver maken. Bij een deformatie van ongeveer 30% is de elasticiteit van het netwerk niet meer gedomineerd door de buiging van de fibers, maar door het rekken van de fibers. We laten zien dat het strain-stiffening gedrag van collageen wijst naar een mechanisch, kritische transitie. Door de polymerizatie condities aan te passen, laten we zien dat het strain-stiffening gedrag van collageen, en de stijfheid daarvan bij lage krachten, afhankelijk is van de lokale architectuur (connectiviteit). Het athermisch netwerk model kan nu gebruikt worden om collageen netwerken te creëren met bepaalde stijfheden voor cel-matrix experimenten.

In hoofdstuk 7 hadden we als doel gesteld om te kijken naar het effect van tractiekrachten van cellen op de mechanische eigenschappen van collageen, in

analogie van hoofdstuk 3. Echter, we zagen geen enkel verschil tussen de mechanische eigenschappen van netwerken met en zonder cellen. Gebruikmakend van microscopie laten we zien dat de afwezigheid van een effect kwam door de gelimiteerde celspreiding in deze netwerken. We bestudeerden meerdere factoren die invloed zouden moeten hebben op celspreiding, maar zonder success. We concluderen dat, ook al heeft de cellijn die we gebruiken in principe de juiste integrines (of 'handen') om te kunnen binden aan collageen, de cellijn niet ideaal is voor het bestuderen van cellulaire tractiekrachten op collageen mechanica.

In dit proefschrift hebben we de oorsprong van het strain-stiffening gedrag van twee belangrijke ECM netwerken onderzocht, namelijk die van fibrine en collageen. Een belangrijke nieuwe observatie is dat de moleculaire structuur van de *fibers* erg belangrijk is voor de mechanische eigenschappen van het *netwerk*. Ook al hebben fibrine en collageen fibers in principe een vergelijkbare diameter en netwerk structuur, de oorsprong van hun mechanische eigenschappen zijn heel anders: Fibrine netwerken hebben een elasticiteit dat voorkomt door thermische fluctuaties en de fibers zijn erg uitrekbaar (tot $\sim 200\%$), terwijl collageen netwerken zich gedragen als athermische fiber netwerken, en breken bij ongeveer 40% uitrekking. Deze verschillen komen door het verschil in interne pakkingstructuur: Collageen fibers zijn heel stijf en bevatten ongeveer 1000 monomeren in een fiber doorsnede, terwijl fibrine fibers veel flexibeler zijn en ongeveer 100 monomeren hebben in een fiber doorsnede. Ook spelen ontvouwingsdomeinen in de monomeren een belangrijke rol in de mechanica van fibrine netwerken bij grote deformaties.

Het werk van dit proefschrift geeft inzicht in de oorsprong van mechanische mankementen in ziektes gerelateerd aan genetische mutaties in collageen en fibrine. Ook geven de mechanische modellen gepresenteerd in dit werk een mooie basis voor het ontwerpen van meer complexe biologische of synthetische polymeren met bepaalde gewenste stijfheid, bijvoorbeeld voor tissue engineering. Ook heeft het verschil in de mechanische eigenschappen tussen fibrine en collageen wellicht consequenties voor cellular mechanosensing.

