

Nederlandse Samenvatting

Introductie

Membraanblaasjes (ook wel vesikels) vervullen belangrijke rollen binnen de cellulaire biologie. Deze blaasjes bestaan uit een dubbele laag van fosfolipiden, waardoor ze een afgescheiden holte hebben. In de biologie spelen deze blaasjes bijvoorbeeld een belangrijke rol in het zenuwstelsel en voor het transport binnen en tussen cellen. Daarnaast worden artificiele membraanblaasjes (ook wel liposomen) gebruikt als nanocapsules voor de toediening van medicijnen. In dit proefschrift komen liposomen en celblaasjes, membraanblaasjes die een rol spelen in de communicatie tussen cellen, aan bod.

Chemische en fysische eigenschappen van deze membraanblaasjes spelen een grote rol in hun gedrag, zoals hun stabiliteit in het bloed en de opname door cellen. Recent is duidelijk geworden dat ook de mechanische eigenschappen van de blaasjes invloed lijken te hebben op dit gedrag. Maar op dit moment zijn mechanische metingen aan kleine blaasjes moeilijk te verrichten en is er geen geschikt model voor data interpretatie. Een complicatie hierbij is dat de blaasjes ongeveer een miljoen keer kleiner zijn (in volume) dan een cel en daarmee kleiner dan zichtbaar kan worden gemaakt met een lichtmicroscop.

Hier maken we gebruik van een atoomkrachtmicroscop om metingen te verrichten aan de mechanica van membraanblaasjes. Deze microscoop (ook wel tastmicroscop genoemd) kan met zeer hoge resolutie afbeeldingen maken door met een scherpe naald een oppervlakte af te tasten. Deze scherpe naald zit vast aan een hefboompje, waar een laser op wordt geschenen. Bewegingen van de naald kunnen zeer nauwkeurig worden gedetecteerd op deze wijze. Dezelfde techniek kan ook gebruikt worden voor mechanische metingen.

Doel van dit proefschrift

Het doel van dit proefschrift is om nauwkeurige mechanische metingen aan kleine membraanblaasjes (beide artificieel en natuurlijk) mogelijk te maken en te begrijpen welke factoren de stijfheid van deze membraanblaasjes beïnvloeden.

De bevindingen in dit proefschrift

Het gebruik van een atoomkrachtmicroscop voor het meten van mechanica van kleine biologische materialen is eerder veel toegepast voor metingen aan virusdeeltjes. Maar er zijn een aantal complicaties die optreden bij de zachte membraanblaasjes. De membraanblaasjes vervormen bijvoorbeeld sterk wanneer ze in aanraking komen met het oppervlakte, waardoor bijvoorbeeld de vorm lastiger is om te bepalen. Daarnaast kan het materiaal waaruit de membraanblaasjes bestaat, gemakkelijk aan de tip van de atoomkrachtmicroscop vastplakken. In **hoofdstuk 2** beschrijf ik hoe deze experimenten zorgvuldig uitgevoerd kunnen worden.

In **hoofdstuk 3** wordt deze aanpak gebruikt voor het meten aan synthetische blaasjes, ofwel liposomen. We laten zien dat de grote van de tip in de atoomkrachtmicroscop een grote invloed heeft op de uitkomst van experimenten, en de verscheidenheid in observaties in eerdere experimenten kan verklaren. Hier introduceer ik ook een nieuw model voor de interpretatie van mechanische metingen aan kleine blaasjes. Dit model is gebaseerd op de uitgebreid geteste theorie van Canham en Helfrich, die de mechanica van grote blaasjes goed beschrijft. Het gedrag dat ons model beschrijft komt zeer goed overeen met de experimentele bevindingen. Daarnaast laten we zien dat door deformatie op het oppervlakte de blaasjes veel stijver worden door de opbouw van een osmotische druk binnen de blaasjes. Dit effect is waarschijnlijk ook van groot belang tijdens vervormingen van de blaasjes door middel van andere prikkels. Uiteindelijk schatten we de buigmodulus, een belangrijke intrinsieke elastische eigenschap van de membranen van deze liposomen.

Er bestaan ook membraanblaasjes die door meerdere membranen omgeven zijn, deze zijn het onderwerp van **hoofdstuk 4**. Deze blaasjes hebben voordelen voor het gebruik als nanocapsule voor het toedienen van medicijnen. Ze hebben bijvoorbeeld meer volume voor hydrofobe drugs. Hier laten we zien dat we kunnen bepalen hoeveel membranen blaasjes hebben; dit doen we aan de hand van de penetraties van membranen. Dit staat ons toe de vorm en stijfheid van blaasjes met 1 tot 5 membranen te vergelijken. We zien dat de blaasjes met meer membranen in een rondere vorm blijven en stijver zijn. Dit zijn eigenschappen die eerder waren gesuggereerd om het binnenkomen van de blaasjes in de cel te vergemakkelijken. Dit zou een extra voordeel kunnen zijn voor het gebruik van blaasjes met meer membranen voor medicijntoe-diening.

Tot nu toe hebben we op artificiële membraanblaasjes gefocust, maar in **hoofd-**

stuk 5 komen natuurlijke celblaasjes aan bod. We bekijken de eigenschappen van celblaasjes uitgescheiden door rode bloed cellen van gezonde donoren, maar ook van een patiënt met een bloedaandoening (Hereditary Spherocytosis). Deze patiënten hebben stijvere rode bloedcellen, die sneller verwijderd worden uit het bloed, en daarmee het ziektebeeld (bloedarmoede met symptomen als vermoeidheid en hoofdpijn) veroorzaken. De natuurlijke blaasjes bevatten veel eiwitten, beide in de waterige binnenkant en in de membraan. Toch zien we dat de vervorming van deze celblaasjes zeer sterk overeenkomt met het gedrag geobserveerd in hoofdstuk 3 voor artificiële liposomen. Verder zien we dat de patiënten celblaasjes uitscheiden die een significant lagere buigmodulus hebben dan de celblaasjes uitgescheiden door donoren. De rode bloed cellen van deze patiënten zijn stijver dan van gezonde donoren en het uitscheiden van zachtere blaasjes zou daaraan bij kunnen dragen.

In hoofdstuk 3 hebben we tips van verschillende grootte gebruikt om de geobserveerde mechanica van membraanblaasjes beter te begrijpen. Deze tips waren gemaakt door middel van het slijpen van tips op ruwe oppervlaktes. Normaal gesproken is tipslijtage een beperking voor de toepassing van atoomkrachtmicroscopie: tipslijtage vermindert de resolutie van plaatjes en maakt atoomkrachtmicroscopie experimenten minder reproduceerbaar. In **hoofdstuk 6** laten we zien dat mits dit gecontroleerd gebeurt er juist ook gebruik kan worden gemaakt van tipslijtage. We laten zien dat tipslijtage op ruwe oppervlaktes onder lage krachten geleidelijk plaats vindt en leidt tot tips met grotere radius, maar een afgeronde geometrie. We suggereren dat deze aanpak gebruikt kan worden voor het bekijken van de rol van tipgeometrie in de vele applicaties van atoomkrachtmicroscopie.

In **hoofdstuk 7** verplaats ik de focus van membraanblaasjes en atoomkrachtmicroscopie naar de invloed van een altijd aanwezige mechanische stimulus op de cel: zwaartekracht. Op het cellulaire niveau lijkt zwaartekracht een verwaarloosbare kracht (vergelijkbaar met de kracht uitgeoefend door enkele motoreiwitten, waarvan er zeer veel in een cel aanwezig zijn). Maar individuele cellen laten wel veranderd gedrag zien in condities (in de ruimte of gesimuleerd) met micrograviteit. In dit hoofdstuk bekijk ik de huidige literatuur op zoektocht naar het mechanisme waarmee zwaartekracht wordt waargenomen.

Het werk in dit proefschrift legt een basis voor de verdere verkenning van de mechanica van membraanblaasjes en de rol hiervan voor de interactie met de cel. In **hoofdstuk 8** bespreek ik vervolggexperimenten op, en verdere toepassingen van,

dit werk. In het bijzonder behandel ik het meten van de buigmodulus van enkele membraanblaasjes en aanvullende metingen van de strekmodulus. Ook adresseer ik verwachtingen en wat we kunnen leren over andere kleine blaasjes met de aanpak beschreven in dit proefschrift. Uiteindelijk bekijk ik hoe we toe kunnen werken naar het optimaliseren van de stijfheid van liposomen (als nanocapsule voor medicijntoediening) voor optimale opname en misschien wel targeting van medicijnen.