

DISS. ETH NO. 19509

Osteoclasts cultured on micro-patterned surfaces: Dynamics
and architecture of the adhesion-cytoskeleton complex

A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

FABIAN ANDREA ANDEREGG

MSc ETH Zurich

Born on March 23rd, 1982

citizen of Meiringen (BE)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Marcus Textor, examiner

Prof. Dr. Benny Geiger, co-examiner

Prof. Dr. Ralph Müller, co-examiner

Dr. Katharina Maniura, co-examiner

Dr. Mirren Charnley, co-examiner

2011

Multicellular organisms are complex conglomerates of differentiated cell types, each responsible for specifically assigned tasks. Thereby, the integral capacity of the entire organism is divided into many sub-processes carried out by specialist cells, resulting in an increased efficiency and a pronounced biological fitness of the organism. The price that is paid for this gain is an enhanced need for the exchange of information and thereby an increase in the complexity of the communication system. During the last twenty years it has become more and more apparent that the main hubs of cellular communications are their adhesion sites, giving them not only the possibility to retrieve signals and stimuli from other cells via the “classical” growth factor and cytokine pathways but also to integrate chemical and physical signals provided by the surrounding matrix. This phenomenon, known as mechanosensing, has attracted a lot of attention in recent years, highlighting the fact that many fundamental biological processes, like proliferation, survival and differentiation, are driven by physical cues provided by the cells micro-environment.

A tissue which is particularly sensitive to mechanical load or mechanical stresses is the load-bearing support structure in vertebrates, known as the skeleton. The skeleton is composed of a multitude of bone structures, individually optimized for their specific function in an evolutionary process of reoccurring cycles of degradation and *de-novo* synthesis by two cell types, the osteoclasts and osteoblasts. The fragility of the balance between the bone degrading activity of osteoclasts and bone formation by osteoblasts is highlighted by the wealth of human diseases related to its malfunction. Osteoporosis, rheumatoid arthritis, multiple myeloma and metastatic cancers are only few of the skeletal diseases in humans that can be related to excessive in osteoclastic activity and become a more pronounced plaque in aging societies.

The bone-degrading function of osteoclasts depends on cell polarization and the formation of an adhesive super-structure known as the sealing zone (SZ). The SZ is composed of a condensed, interconnected network of podosomes which are the adhesion-mediating building blocks in osteoclasts. Individual podosomes consist of a central bundle of actin filaments surrounded by an adhesive ring containing integrin and multiple adhesome components. In mature SZs, the cores of podosomes form a central ring that is lined by inner and outer adhesion belts consisting of integrins and multiple “plaque proteins”. It has been recently shown that both the chemical and physical properties of the underlying matrix affect the dynamics, stability and size of these podosome-based super-structures. Greater understanding of the mechanisms underlying the mechanosensing properties of podosomes and their super-structures will be essential to advance our progress in defeating diseases, like osteoporosis and multiple myeloma.

The main objective of this study was to determine the relationship between matrix adhesion and the formation, stability and growth of the SZ in cultured osteoclasts and thereby to gain insight into (a) fundamental, intrinsic SZ properties and (b) propose a possible mechanism for the control of bone degradation in a chemically heterogeneous environment.

Differentiated, actin-GFP expressing RAW 264.7 osteoclasts were cultured on micro-patterned glass substrates displaying integrin-adhesive vitronectin areas of various sizes and shapes, separated by non-adhesive PLL-*g*-PEG barriers. This platform enabled us to demonstrate for the first time, in a quantitative manner, that SZs are intrinsically circular, centripetally expanding podosomal superstructures. Thereby, SZs usually undergo a cyclical process in the scale of minutes of immediate expansion after formation followed by a stationary phase before retracting upon disintegration. This cyclical behavior was most pronounced on bone control substrates (microscopy data kindly provided by Dafna Geblinger) and striped micro-patterns, showing the most prominent increase in SZ size. Additionally, SZs limited in their expansion by PLL-*g*-PEG barriers displayed a drastic

increase in stability compared to non-patterned glass controls often displaying only fragmented SZs. Furthermore, the formation and the expansion of the SZs was adhesion dependent, requiring continuity of the substrate adhesiveness on the micrometer scale. SZ formation requires an adhesive area of at least $4 \times 4 \mu\text{m}^2$, while expansion was effectively blocked upon interaction with a non-adhesive PLL-*g*-PEG barrier exceeding the size range of an individual podosome ($\sim 1 \mu\text{m}$). Below this threshold SZs were capable of expanding across a non-adhesive gap in only very rare number of cases ($\sim 1\%$). This expansion occurred via an adhesion independent process by extension of lateral actin fibers, indicating that beside the regular adhesion dependent process of SZ progression a far less effective, though possible, mechanism based on actin rather than integrin activity exists. This suggests that besides the expected, outside-in stimulation of podosome formation via integrin molecules also an actin based inside-out stimulation is possible. Additionally, we showed using one-dimensional, striped micro-patterns that SZ fusion only occurs upon the merger of the outer adhesive ring domains of two approaching SZs, as only rings located on the same adhesive stripe fused, while fusion across a PLL-*g*-PEG gap was prohibited. This clearly indicates that - in addition to SZ expansion - SZ fusion also requires continuity of substrate adhesiveness.

Using again striped micro-patterns we showed that despite the intrinsic circular shape of SZs, their progression is regulated at a local rather than a global scale. Following an initial uniform growth phase, the rings adapt an elongated, sausage like shape (parallel to the stripes) upon reaching the non-adhesive PLL-*g*-PEG barriers. Thereby only the regions of the SZ ring associated with the continuous adhesive vitronectin stripe kept expanding, while ring regions in contact with the PLL-*g*-PEG barrier stalled in their expansion. Ring regions hindered in their progression adapted their architecture by reducing the amount of adhesive plaque molecules associated with the interlinked, actin-rich podosome cores.

In summary, our results identify SZs as true adhesive superstructures, whose formation and dynamics are regulated by the spatial organization and presentation of integrin-responsive adhesion chemistry. Based on the results obtained on engineered, artificial model surfaces we postulate an adhesion dependent mechanism, which allows osteoclasts to degrade heterogeneous bone with sub-cellular resolution while chemically less favorable (i.e. less adhesive) regions block SZ expansion and thereby prevent bone resorption locally. In addition, the architectural rearrangements following a stop in SZ progression, as well as the observation that SZ fusion depends on the merging of the outer adhesive domains of a SZ, highlight the possibility of a force dependent mechanism regulating SZs, similar to other adhesive structures (in particular focal adhesions). Therefore, forces present in and required for SZ formation, such as actomyosin contractility, may contribute to the mechanosensitivity of these adhesive super structures.

Multizelluläre Organismen sind komplexe Konglomerate aus verschiedensten Zelltypen, die jeweils für spezifische Aufgaben zuständig sind. Dabei wird die Funktion des gesamten Organismus in zahlreiche Subprozesse aufgeteilt und einem jeweils spezialisierten Zelltyp zugewiesen. Dadurch erhöht sich die Effizienz der Prozesse, und der Organismus gewinnt an Kompetivität und biologischer Fitness. Der Preis, der dafür bezahlt werden muss, ist ein erhöhter Bedarf an Informationsfluss zwischen den einzelnen Zellen, der ein komplexeres Kommunikationssystem bedingt. In den letzten zwanzig Jahren wurde es immer deutlicher, dass die zellulären Adhäsionsstellen als Zentren dieser interzellulären Kommunikation dienen. Dadurch bietet sich den Zellen nicht nur die Möglichkeit, Signale anderer Zellen über die "klassischen" Signalwege mittels Wachstumsfaktoren und Cytokinen zu empfangen, sondern auch direkt Signale aus der sie umgebenden extrazellulären Matrix aufzunehmen. Dieses Phänomen ist unter dem Begriff "Mechanosensing" bekannt und hat in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen, zeigte sich doch, dass viele fundamentale zelluläre Prozesse wie Proliferation, Überleben oder Differenzierung durch äussere Stimuli der Mikroumgebung gesteuert werden.

Ein Gewebe, das besonders empfindlich auf mechanische Belastungen reagiert, ist das tragende Skelett in Wirbeltieren. Es besteht aus einer Vielzahl von einzelnen Knochen, die individuell auf ihre spezifische Funktion angepasst werden. Dabei durchlaufen sie einen ständigen zyklischen Prozess von Abbau und Aufbau, der durch die beiden Zelltypen der Osteoklasten und Osteoblasten reguliert wird. Wie fragil das Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und Synthese ist, zeigt sich durch die Vielzahl der humanen Krankheiten, die mit einer diesbezüglichen Fehlfunktion assoziiert werden. Osteoporose, rheumatoide Arthritis, multiple

Myeloma sowie metastatische Krebskrankheiten sind nur einige der menschlichen Skelettkrankheiten, die auf eine übermässige Aktivität der knochenabbauenden Osteoklasten zurückgeführt werden können und in einer ständig alternden Gesellschaft zunehmend an Gewicht gewinnen.

Die Fähigkeit Knochen abzubauen, hängt in Osteoklasten von einer Zellpolarisation und der damit verbundenen Ausbildung einer adhäsiven Superstruktur, der sogenannten Sealing Zone (SZ), ab. Die SZ besteht aus einem verdichteten, eng vernetzten Verbund von Podosomen, den Haft vermittelnden Bausteinen in Osteoklasten. Einzelne Podosome bestehen aus zentralen Aktin Filamenten umgeben von einem adhäsiven Ring aus Integrinen und einer Vielzahl von Adhäsionskomponenten. In ausgewachsenen SZs bilden die Aktin Kerne der Podosome einen zentralen Ring der beidseitig von einem Band Adhäsionsproteine gesäumt wird. Kürzlich wurde gezeigt, dass sowohl chemische wie auch physikalische Eigenschaften der umgebenden Matrix die Dynamik, Stabilität und Grösse dieser Podosome-basierten Superstruktur beeinflussen. Ein grösseres Verständnis der Mechanismen, die den mechanosensitiven Eigenschaften von Podosomen und deren Superstrukturen zugrunde liegen, wird essentiell sein, um den Kampf gegen Krankheiten wie Osteoporose und multiple Myeloma voranzubringen.

Das Hauptziel dieser Forschungsarbeit war es die Beziehung zwischen Matrixadhäsion und der Ausbildung, der Stabilität und der Expansion von SZs in kultivierten Osteoklasten zu untersuchen und dabei Einblicke in fundamentale, intrinsische Eigenschaften von SZs zu gewinnen sowie zusätzlich einen möglichen Mechanismus vorzuschlagen, der es den Zellen erlaubt, Knochen mit subzellulärer Auflösung abzubauen.

Ausdifferenzierte, Aktin-GFP exprimierende RAW 264.7 Osteoklasten wurden auf Glassubstraten kultiviert, die ein Micro-pattern aus Integrin-bindenden Vitronectin Flächen in unterschiedlichen Grössen und Formen aufwiesen. Dabei wurden die einzelnen Flächen mittels PLL-g-PEG Barrieren voneinander abgetrennt. Diese Plattform ermöglichte es uns zum ersten Mal, quantitativ zu zeigen, dass SZs intrinsisch zirkuläre, zentrifugal expandierende Strukturen sind. Dabei durchlaufen sie für gewöhnlich einen zyklischen Prozess (im Bereich von Minuten), der mit einer unmittelbaren Expansion nach der Formierung beginnt, gefolgt von einer stationären Phase und mit einer Periode des Schrumpfens endet, bevor sich die Struktur auflöst. Dieses zyklische Verhalten fanden wir am ausgeprägtesten auf Kontrollsubstraten aus Knochen (Die dazugehörigen Mikroskopiedaten wurden grosszügigerweise von Dafna Geblinger zur Verfügung gestellt.) und gestreiften Micro-patterns, wo die Expansionsphase am deutlichsten war. Zusätzlich waren die in ihrer Ausbreitung durch die PLL-g-PEG Barrieren limitierten SZs auf Micro-patterns deutlich stabiler als diejenigen auf homogenen Glas Kontrolloberflächen, wo die SZs oft nur fragmentiert vorzufinden waren. Die Formierung sowie die Expansion von SZs stellten sich als adhäsionsabhängig heraus und benötigte ununterbrochene Kontinuität der Substratadhäsion in der Grössenordnung von wenigen μm . Die Entstehung einer SZ benötigte eine minimale adhäsive Fläche von $4 \times 4 \mu\text{m}^2$, während die Expansion bereits von einer Barriere, welche die Grössenordnung eines einzelnen Podosomes ($\sim 1 \mu\text{m}$) überstieg, erfolgreich verhindert wurde. War die anti-adhäsive Barriere unterhalb dieses Grenzwertes, war es den SZs in raren Einzelfällen ($\sim 1\%$) möglich, über das PLL-g-PEG hinweg zu expandieren. Dabei erfolgte die Expansion via einen adhäsionsunabhängigen Prozess mittels der Ausdehnung von lateralen Aktin Filamenten. Dies deutete darauf hin, dass nebst der regulären, strikt adhäsionsabhängigen Progression von SZs, ein, wenn auch deutlich weniger effizienter, Prozess mittels Aktin anstelle von Integrin möglich ist. Dadurch wurde klar, dass die Podosombildung nicht nur über die bekannte Stimulation über die Matrix von aussen via Integrine, sondern auch von innen heraus via Aktin möglich ist. Zusätzlich konnten wir durch die Benützung von eindimensionalen, gestreiften micro-patterns zeigen, dass die Fusion von SZs

nur erfolgt, wenn die zwei äusseren Adhäsionsdomänen der beiden Ringe fusionieren. Dies offenbarte sich in der Tatsache, dass nur Ringe, die auf *demselben* adhäsiven Streifen lokalisiert waren, fusionieren konnten, während benachbarte Ringe, die durch eine PLL-*g*-PEG Barriere getrennt wurden, sich nie vereinten. Dies zeigt deutlich, dass nebst der SZ Expansion auch die Fusion von der Kontinuität der Substratadhäsion abhängt.

Durch die Benützung derselben gestreiften micro-patterns konnten wir zeigen, dass trotz der intrinsischen Tendenz von SZs eine zirkuläre Form einzunehmen, ihre Progression auf *lokaler* Ebene reguliert wird. Nach einer anfänglich uniformen Expansionsphase adaptierten die Ringe eine längliche Form parallel zum Streifenmuster, sobald sie in Kontakt mit der PLL-*g*-PEG Barriere kamen. Dabei expandierten nur die beiden Regionen der SZs weiter, die mit dem kontinuierlich adhäsiven VN Streifen in Kontakt waren, während die PLL-*g*-PEG assoziierten Regionen ihre Expansion stoppten. Diese letzteren Regionen adaptierten ihre Architektur an ihre neue Ausgangslage insofern, als dass sie die Menge von adhäsiven Plaque-Molekülen, die mit den aktinreichen Podosomkernen verbunden waren, stark reduzierten.