

Diss. ETH No. 19374

Engineering *in vitro* environments to study cell-cell and cell-matrix interactions

DISSERTATION

Submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

by

ANA SALA

Chemical Engineer, Institut Quimic de Sarria

born April 4, 1978

Spanish

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Janos Vörös, examiner

PD Franz E. Weber, co-examiner

Dr. Martin Ehrbar, co-examiner

Prof. Dr. Matthias Lutolf, co-examiner

2010

Abstract

Traditionally, tissue engineering has aimed at the creation of functional three-dimensional (3D) tissues for therapeutic applications such as the replacement of damaged tissues. While new important mechanical and structural features for scaffolds and tissue analogs are continuously being explored, our understanding of biological and physical cues as well as their spatiotemporal coordination during tissue regeneration is only limited and consequently restricts the engineering of functional tissues based on rational design principles. Whether consecutive steps of native tissue development need to be recapitulated, tissue geometry fully reestablished or whether one can take advantage of morphogenetic mechanisms to grow functional tissues remain unsolved questions.

In vivo, tissues are characterized by a complex 3D architecture with a spatial and hierarchical heterogeneous distribution of cells and extracellular matrix (ECM) components. The local microenvironment that surrounds cells is mainly composed of the extracellular matrix, neighboring cells, soluble as well as immobilized factors, and mechanical forces. The integration of these components results in spatiotemporal and tightly controlled biochemical and biophysical arrays of signals that will determine the dynamic behavior of cells. Thus, active microenvironments provide cells with the required information fundamental for tissue formation, homeostasis and regeneration. Nevertheless, while cells isolated from such natural tissues retain their capacity to proliferate and migrate, in culture, they often present phenotypic instability and lose their ability to reassemble into complex functional 3D tissue-like structures.

At this stage we are far from understanding the complex cell-matrix and cell-cell interactions involved in tissue formation, homeostasis, healing, and pathology. In order to study such events and to manipulate cellular behavior, test systems and *in vitro* models that in a predictable and biologically relevant manner present bioactive entities such as growth factors and cytokines are necessary. The aim of this thesis is to investigate and to develop *in vitro* platforms to study cell-cell and cell-matrix interactions. A novel fully synthetic PEG-based hydrogel based on the FXIIIa-catalyzed coupling scheme and which allows for the covalent incorporation of growth factors

without compromising the protein's bioactivity, is used as main component along the thesis. Such reductionist *in vitro* model enables to mimic the natural ECM while reducing its complexity into single events which can be combined in a controllable fashion, and thus allows for the study of specific cell–cell or cell-ECM interactions.

The initial focus of the thesis was to use this PEG system as an *in vitro* model to better understand the interplay of biophysical and biochemical effectors in controlling 3D cell migration. In Chapter 4, the influence of matrix stiffness on proteolytic cell migration *in vitro* and *in vivo* is explored. Six poly(ethylene glycol) (PEG)-based hydrogels displaying constant amounts of integrin-binding ligands (RGD) were prepared, differing in matrix stiffness (range: 60 to 480 Pa) and susceptibility to degradation by matrix metalloproteases (MMPs). Time-lapse microscopy was used to show that the migration behavior of single preosteoblastic cells is strongly dependent on matrix stiffness. Two different stiffness regimes were identified, with a non-proteolytic migration mode dominating at relatively low and proteolytic migration at higher matrix stiffness. Subsequent *in vivo* experiments revealed a similar stiffness dependence of matrix remodeling, albeit less sensitive to the matrix' MMP-sensitivity. Therefore, our aECM model system is well suited to unveil the interconnectedness of biophysical and biochemical determinants of physiologically relevant cell migration phenomena.

Next, we focus on the development of a strategy to site-specifically tether patterns of ligands on a surface (presented in Chapter 5). The stable immobilization of peptides like RGD to surfaces has been achieved via chemical bonding, biotin streptavidin interaction, or photo-crosslinking. More challenging is the immobilization of proteins, since methods applied to immobilize peptides are either not specific or versatile enough or might even compromise the protein's bioactivity. In this study, we describe a platform that allows for the FXIIIa-enzymatic immobilization and patterning of biologically active ligands, including peptides and proteins on passive PLL-*g*-PEG-coated surfaces. By this modular and flexible design principle, we were able to functionalize surfaces directly with peptides and growth factors or to precisely position poly(ethylene glycol) (PEG)-like hydrogels for the presentation of growth factors as exemplified with vascular endothelial growth factor (VEGF).

In the last part of this thesis (Chapter 6) our main focus was to engineer 3D tissue-like models. Such models hold enormous potential to study physiological, pathological, and regenerative processes in an environment that bridges the gap between traditional *in vitro* 2D culture systems and animal models. Although methods to pattern cells or matrices in 3D have been described, reliable methods to simultaneously arrange cells, matrix components, and biological cues into rationally designed instructive milieus are, nevertheless, not yet available. Such spatially defined guiding microenvironments may, in principle, be necessary to initiate the formation of artificial tissues by morphogenetic processes. In this Chapter, we introduce a flexible engineering strategy that relies on the fusion of our aECM with patterning techniques and a layer-by-layer approach. By rational arrangement of cells and well-defined heterogeneous extracellular cues we report the control over the direction of cell migration and the generation of artificial vascularized bone tissue-like constructs.

Zusammenfassung

Die technologische Entwicklung in der Gewebekultur strebt nach therapeutischen Anwendungen, wie dem Ersatz von beschädigtem Gewebe durch im Labor gezüchtete funktionelle Gewebe. Bezüglich der mechanischen und strukturellen Eigenschaften von stützenden Konstrukten und Nachbildungen natürlicher Gewebe werden ständig neue Erkenntnisse gewonnen. Ganz im Gegensatz dazu ist nur wenig Wissen über den Einsatz richtungsweisender biologischer und physikalischer Faktoren vorhanden. Muss für das ideale künstliche Gewebe der Ablauf biologischer Prozesse rekapituliert werden? Muss die Geometrie exakt mit der Situation *in vivo* übereinstimmen? Oder erlaubt der Ablauf morphogenetischer Prozesse eine einfachere Grundform zur Erschaffung eines funktionsfähigen Gewebes? Diese Fragen gilt es nun zu beantworten.

Im lebenden Organismus sind Gewebe komplexe dreidimensionale Strukturen. Diese bestehen aus räumlich und hierarchisch, heterogen verteilten Zellen und Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM). Die Einflüsse, welche auf die Zelle in ihrer Mikroumgebung einwirken, stammen von benachbarten Zellen, löslichen und gebundenen biologischen Faktoren sowie mechanischen Kräften. Das Zusammenspiel dieser Einflüsse resultiert in einer hochkomplexen Kaskade zeitlich und räumlich definierter biochemischer und biophysikalischer Signale, welche das Verhalten der Zelle bestimmen. Die Signale aus der Mikroumgebung der Zelle sind für Bildung, Homeostase und Regeneration eines Gewebes also essentiell. So proliferieren und migrieren Zellen sehr wohl in der traditionellen zweidimensionalen Zellkultur, verändern aber möglicherweise ihren Phenotyp und verlieren die Fähigkeit sich in ihrer ursprünglichen Funktion in eine komplexe Gewebestruktur einzupassen.

Gegenwärtig verstehen wir nur einen Bruchteil der komplexen Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen welche zur Bildung, Homeostase, Heilung oder zu pathologischen Formen von Gewebe führen. Es wird ein *in vitro* Modell benötigt welches uns erlaubt, diese Interaktionen unter klar definierten Bedingungen zu studieren, uns also den Einfluss von bioaktiven Faktoren auf Zellen unter biologisch relevanten Bedingungen widerspiegelt.

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Entwicklung und Evaluation eines solchen *in vitro* Modells. Der Grundbaustein des Systems ist ein Polyethylenglycol (PEG)-basiertes Hydrogelsystem. Die Vernetzung der Bausteine zu einem Gels basiert auf dem katalytischen Kupplungsmechanismus der Transglutaminase FXIIIa. Neben der Grundbausteine können darüber hinaus auch Wachstumsfaktoren kovalent in das PEG Hydrogel eingebaut werden ohne dabei die Bioaktivität der Proteine zu beeinflussen. Damit kann die Situation im lebenden Organismus simuliert werden, gleichzeitig wird aber dessen Komplexität auf einzelne Zusammenhänge, welche beliebig und in kontrollierter Form kombiniert werden können, reduziert.

Zu Beginn der Doktorarbeit wollten wir das Zusammenspiel biophysikalischer und biochemischer Faktoren welche die Zellmigration im dreidimensionalen Raum bestimmen untersuchen. Dazu wird in Kapitel 4 der Einfluss der Festigkeit einer Matrix auf proteolytische Zellmigration *in vitro* und *in vivo* untersucht. Sechs PEG-basierte Hydrogele mit variablen Festigkeiten zwischen 60 und 480 Pa wurden hergestellt. Alle Gele wurden mit derselben Konzentration des Integrinliganden RGD funktionalisiert und enthielten daneben auch noch Sequenzen, welche den Abbau durch Metalloproteasen (MMPs) ermöglichten. Die Migration der Zellen in diesen Gelen wurde mittels Zeitraffermikroskopie evaluiert. Die Auswertung der Aufnahmen zeigte eine starke Abhängigkeit des Migrationsverhaltens einzelner preosteoblastischer Zellen von der Festigkeit der Matrix. Zwei für die Zellmigration wichtige Festigkeitsbereiche wurden definiert. In Gelen mit einer tieferen Festigkeit dominiert eine nicht proteolytische Migration, während bei höheren Festigkeiten die proteolytische Migration dominierend ist. *In vivo* Experimente bestätigten diese Erkenntnisse; allerdings war im lebenden Organismus die Sensitivität der Matrix bezüglich Abbau durch MMPs weniger ausschlaggebend als *in vitro*.

Unser nächstes Ziel war es Liganden in einer spezifischen Anordnung an eine Oberfläche zu binden (Kapitel 5). Verschiedenste aktive Peptiden wurden bereits erfolgreich in Mustern an Oberflächen gebunden. Die dazu verwendeten Methoden reichen von chemischen Reaktionen, Biotin-Streptavidin Wechselwirkungen bis hin zu Reaktionen via Photokatalyse. Die spezifische Kopplung von Proteinen an eine Oberfläche gestaltet sich allerdings viel schwieriger, sind die für Peptide angewandten

Methoden doch oft zu wenig spezifisch oder beschädigen gar die Bioaktivität der Wachstumsfaktoren. In dieser Arbeit zeigen wir nun wie Muster von kovalent gebundenen Peptiden und/oder Proteinen via Transglutaminase FXIIIa kovalent auf PLL-g-PEG passivierten Oberflächen geformt werden können. Dieselbe Technik haben wir weiterführend dazu genutzt PEG-Hydrogele punktgenau auf Oberflächen zu platzieren, was wir anhand des Einbaus von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gezeigt haben.

Im letzten Teil der Arbeit fokussierten wir uns darauf, unter Verwendung der zuvor etablierten Methoden eine dreidimensionale Matrix zur Simulation von natürlichem Gewebe zu entwickeln (Kapitel 6). Solch ein Modell hat das Potential die Lücke zwischen zweidimensionaler Zellkultur und Tierexperiment zu füllen und uns die Erforschung physiologischer, pathologischer und regenerativer Prozesse auf zellulärer Ebene zu ermöglichen. Obwohl bereits Methoden zur spezifischen Anordnung von Zellen oder Matrixkomponenten im dreidimensionalen Raum entwickelt sind, gab es bisher keine Möglichkeit gleichzeitig Zellen, Wachstumsfaktoren und Matrixkomponenten in einer biologisch relevanten Anordnung zu platzieren. Es ist anzunehmen, dass solche räumlich definierte, richtungsweisende Anordnungen biologischer Faktoren nötig sind, um morphogenetische Prozesse zu initiieren, welche schlussendlich zur Entstehung künstlicher Gewebe führen. Hier präsentieren wir nun eine Technik, welche unsere synthetische PEG basierte EZM mit den von uns vorgestellten Methoden zur strukturierten Anbindung von Proteinen und Peptiden auf Oberflächen und der schichtweisen Anordnung von PEG Matrizen kombiniert. Mithilfe dieser Techniken ist es uns möglich, durch logische Anordnung von klar definierten, heterogen verteilten extrazellulären Faktoren, Zellmigration zu kontrollieren und vaskularisierte, dem Knochengewebe ähnliche Konstrukte auszubilden.