

DISS. ETH NO. 27206

Tissue growth and repair processes studied in 3D microtissue platforms

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Mario Christian Benn

Dr. med. vet., University of Zurich

born on 04.08.1985

citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Dr. h.c. Viola Vogel, examiner
Prof. Dr. Philip Kollmannsberger, co-examiner
PD Dr. Gertraud Orend, co-examiner

2020

Abstract

Tissue growth and repair are essential for multicellular life and delicately organized like a well-orchestrated symphony by spatio-temporally controlled cell proliferation and differentiation, which is tightly linked to the production and remodelling of extracellular matrix (ECM). This is particularly relevant during embryogenic development, postnatal growth and tissue regeneration after injury. During tissue growth and repair, little is known how ECM gradients are formed and remodelled. Once homeostasis is reached, maintaining steep gradients within tissues that are tightly associated with organ function is crucial as well. As 2D cell culture approaches do not resemble the biophysical characteristics of tissues, we developed a 3D μ Tissue platform that allows to investigate tissue growth and maturation, and how this is regulated by the tensional state, cell phenotypes and ECM composition at high spatiotemporal resolution in *de novo* grown μ Tissues. Tissue growth processes occur sequentially, while the initial growth front is formed by proliferative cells that assemble a highly stretched provisional fibronectin (Fn) matrix. As the tissue matures, the provisional Fn matrix is interlaced and partially replaced by much stronger tension bearing collagen fibers in the mature inner tissue core. We identified tenascin-C (TNC) in close proximity to Fn and myofibroblasts in the growth front and in regions undergoing repair after tissue rupture events had taken place. The high transient expression of TNC at the growing front was reduced over time as the tissue matured. Crucial other players required to induce the tissue maturation process include tissue transglutaminase (TG2), broad spectrum matrix metalloproteinases (MMP), transforming growth factor beta (TGF- β) signalling, as well as the Fn strain and Fn-collagen interactions. Understanding how ECM gradients regulate tissue growth and the transition of myofibroblasts into quiescent fibroblasts behind the growth front is crucial to develop novel treatment strategies for wound healing, fibrosis and cancer.

Next, we took advantage of our μ Tissue platform to tune key parameters, i.e. tissue tension as function of cleft angle, combined with the presence of supplemented pharmaceutical inhibitors, thus parameters which are technically challenging to be tuned independently in a living system. As expected, reducing cellular contractility through myosin II inhibition reduces tissue tension and thus increases the growth front curvature. Increased cellular contractility through TGF- β 1 supplementation resulted in increased tissue volume and narrowed growth front width in all different cleft angle geometries, which underlines the prominent role of cellular contractility as regulator of tissue growth and maturation processes. Furthermore, TGF- β 1 supplementation did not prevent the reverse myofibroblast-to-fibroblast transition as the tissues matured. Inhibition of fibronectin-collagen-interaction hampered the tissue maturation processes in tissues grown in narrower clefts and subject to higher tissue tension while reducing the mechanical stability as witnessed by an increased tissue rupture probability. Taken

together, we here show that tissue tension can be tuned in *de novo* μ Tissue grown in arrays of microengineered clefts, which opens the door to systematically study how tissue tension impacts tissue growth and maturation. Our data show that tissue tension together with cellular contractility are key parameters which regulate phenotype conversion. We found that cellular contractility is essential to build sufficient tissue tension, required to allow tissue growth and maturation. Tissue tension plays a prominent role in health and disease and our findings can contribute to develop new strategies for treatment of wounds by modulating for example tissue tension and subsequently tissue growth and maturation.

To gain deeper clinical insights, we used collagenous scaffolds that are in clinical use to promote tissue regeneration, and investigated *de novo* μ Tissue growth in commercially available materials, i.e. Geistlich Mucograft® versus Geistlich Bio-Gide® in a preliminary study. As it was unknown whether Fn plays a critical role in promoting tissue growth and healing in these biomaterial scaffolds *in vivo*, we used our established protocol for *de novo* grown μ Tissues in engineered clefts and applied it to manually cut clefts using Geistlich Mucograft® and Geistlich Bio-Gide®. We demonstrated that exposure of the scaffolds to a Fn-containing cell culture medium indeed promoted its adsorption to the scaffold fibers and promoted the early onset of Fn fibrillogenesis, which in turn is suggested to promote fibroblast ingrowth. Coupled with the proof that the *de novo* μ Tissue growth technology can be applied using different biomaterial scaffolds, our work sets the stage for an advanced analytical approach and will contribute to the development of novel diagnostic and therapeutic strategies in wound healing.

Taken together, tissue growth and repair are delicately organized and plenty of different actors are required, but each of their individual actions needs to be precisely initiated and tuned in time. Our findings enabled by 3D μ Tissue platforms on how time-dependent ECM gradients are established by the residing cells, and how this spatiotemporal gradient reciprocally drives a switch in cell phenotype, i.e. from the proliferative myofibroblasts back to the more quiescent fibroblasts, is not only exciting for basic biologists. Serving the need for platforms that are positioned between 2D cell culture and animal studies, they also provide valuable information for applied biomedical researchers who are developing and testing novel therapeutic strategies to promote wound healing, or to combat fibrosis and cancer. In particular, our new insights on how tissue tension together with TGF- β -upregulated cell contractility affects tissue growth processes can contribute to develop novel topical or generalized therapeutic strategies that modulate tissue tension and subsequently tissue growth and maturation in wounds. Combined with the transferability across different scaffolds materials, our platforms allow a plethora of follow up investigations.

This thesis demonstrates the significance of the reciprocal interactions between ECM and the residing cells, which acting together enable a fast build-up of a growth front, followed by a rapid switch towards tissue maturation and mechanical stabilization required to maintain tissue integrity. We expect the presented platforms of *de novo* μ Tissue growth find intriguing new applications for applied biomedical research.

Zusammenfassung

Gewebewachstum und -reparatur ist für ein multizelluläres Leben unerlässlich und ist durch Zellproliferation und durch die Produktion extrazellulärer Matrix (ECM) wie ein gut eingespieltes Symphonieorchester delikate aufeinander abgestimmt. Dies ist besonders während der Embryogenese, des postnatalen Wachstums und der Geweberegeneration nach Verletzungen von grosser Bedeutung. Es ist wenig darüber bekannt, wie ECM-Gradienten während Wachstums- und Reparaturprozessen in Geweben gebildet und aufgelöst werden. Sobald die Homöostase erreicht wird, ist die Aufrechterhaltung steiler Gradienten innerhalb von Geweben, die eng mit Organfunktionen verbunden sind, ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Da 2D-Zellkulturansätze den biophysikalischen Eigenschaften von Geweben nicht ähneln, haben wir eine Mikrogewebeplattform entwickelt, die es ermöglicht, die Gewebereifung, die Spannungszustände, den Zellphänotyp und die ECM-Zusammensetzung mit hoher raumzeitlicher Auflösung in *de novo* gezüchteten 3D Geweben zu untersuchen. Der Gewebewachstumsprozess verläuft hier sequentiell: Die anfängliche Wachstumsfront wird zunächst von proliferativen Zellen gebildet, die eine Matrix aus gestrecktem Fibronectin (Fn) aufbauen. Anschliessend wird während der Reifung des Gewebes die provisorische Fn-Matrix ineinander verwoben und teilweise durch viel stärkere und tragfähigere Kollagenfasern im inneren, reifen Kern des Gewebes ersetzt. Wir haben Tenascin-C (TNC) in unmittelbarer Nähe von Fn und Myofibroblasten in der Wachstumszone und in Regionen, die nach Geweberissen repariert werden, identifiziert. Die hohe transiente Expression von TNC an der Wachstumsfront wurde im Laufe der Zeit mit zunehmender Reifung des Gewebes reduziert. Zu den entscheidenden anderen Akteuren, die erforderlich sind, um den Reifungsprozess von Geweben zu induzieren, gehören die Gewebetransglutaminase (TG2), ein breites Spektrum an Matrix-Metalloproteinasen (MMP), der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF- β) Signalweg sowie der Fn-Streckungszustand und die Fn-Kollagen-Interaktionen. Das Verständnis darüber, wie ECM-Gradienten das Gewebewachstum und den Übergang von Myofibroblasten in ruhende Fibroblasten hinter der Wachstumsfront regulieren, ist entscheidend für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien bei Wundheilung, Fibrose und Krebs.

Zudem haben wir unsere Mikrogewebeplattformen genutzt, um den Einfluss von einzelnen Schlüsselparametern zu untersuchen. Im Fokus liegt vor allem die Gewebespannung als Funktion des Winkels der Spaltöffnung, in dem die Gewebe wachsen, kombiniert mit dem Einfluss ergänzender pharmazeutischer Inhibitoren, also Parameter, deren unabhängige Justierung in einem lebenden System technisch anspruchsvoll ist. Wie erwartet, verringert die Reduzierung der zellulären Kontraktilität durch die Myosin-II-Inhibition die Gewebespannung und erhöht somit die Krümmung der Wachstumsfront. Eine Steigerung der zellulären Kontraktilität durch die Supplementation mit TGF- β 1

fürte zu einem erhöhten Gewebevolumen und einer verringerten Breite der Wachstumsfront in allen verschiedenen Spaltwinkelgeometrien, was die herausragende Rolle der Zellkontraktilität für Wachstum und Reifung der Gewebe unterstreicht. Darüber hinaus wurde die Myofibroblasten-zu-Fibroblasten-Rückbildung während der Gewebereifung durch die TGF- β 1-Supplementierung nicht verhindert. Die Hemmung der Fn-Kollagen-Interaktion führte zu einer verminderten Reifung der Gewebe, die in engeren Spalten wachsen und einer höheren Gewebespannung ausgesetzt sind, während sich eine Verringerung der mechanischen Stabilität in einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Geweberissen niederschlug. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Gewebespannung von *de novo* gezüchteten Geweben mit mikrotechnologisch hergestellten Spaltgeometrien angepasst werden kann, was die Grundlage für weiterführende systematische Untersuchungen über das Wachstum und die Reifung von Geweben bildet. Unsere Daten zeigen, dass die Gewebespannung zusammen mit der zellulären Kontraktilität die wesentlichen Parameter sind, die die Umwandlung des Phänotyps mit der anschließenden Gewebereifung und -wachstum regulieren, ohne dass es Hinweise auf eine Beeinflussung der Sequenz gibt, in der die raumzeitliche Hochregulation von TNC und TG2 den ECM-Umbau und die Myofibroblasten-zu-Fibroblasten-Rückbildung arrangiert.

Um tiefere klinische Einblicke zu gewinnen, verwendeten wir kollagene Gerüste, die zur Förderung der Geweberegeneration im klinischen Einsatz sind, und untersuchten in einer Vorstudie *de novo* gezüchtetes Mikrogewebe in kommerziell erhältlichen Materialien, in diesem Fall Geistlich Mucograft® versus Geistlich Bio-Gide®. Da nicht bekannt war, ob Fn eine entscheidende Rolle bei der Förderung des Gewebewachstums und der Heilung in diesen Biomaterial-Gerüsten *in vivo* spielt, haben wir unser etabliertes Protokoll für *de novo* gezüchtete Mikrogewebe in mikrotechnisch hergestellten Spalten genutzt und es auf manuell geschnittene Spalte in Geistlich Mucograft® und Geistlich Bio-Gide® angewendet. Wir konnten zeigen, dass die Exposition der Gerüste mit einem Fn-haltigen Zellkulturmedium tatsächlich deren Adsorption an die Gerüstfasern fördert und den frühen Beginn der Fn-Fibrillogenese begünstigt, was wiederum das Einwachsen der Fibroblasten fördern soll. In Verbindung mit dem Nachweis, dass die Technologie *de novo* gezüchteter Mikrogewebe in verschiedenen Gerüsten aus Biomaterialien angewendet werden kann, schafft unsere Arbeit die Voraussetzung für einen zukunftsweisenden analytischen Ansatz und wird zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien zur Förderung der Wundheilung beitragen.

Zusammengenommen sind Gewebewachstum und -reparatur äusserst delikat organisiert, weil viele verschiedene Akteure notwendig sind und deren individuellen Aktionen präzise initiiert sowie zeitlich genau aufeinander abgestimmt werden müssen. Unsere durch 3D-Gewebeplattformen ermöglichten

Erkenntnisse darüber, wie zeitabhängige ECM-Gradienten von adhärennten Zellen etabliert werden und wie dieser raumzeitliche Gradient einen reziproken Wechsel des Zellphänotyps antreibt, also von den proliferativen Myofibroblasten zurück zu den eher ruhenden Fibroblasten, sind nicht nur für Grundlagenbiologen von Interesse. Indem sie dem Bedarf an Plattformen zwischen 2D-Zellkulturen und Tierversuchen nachkommen, liefern sie auch wertvolle Informationen für angewandte biomedizinische Forscher, die neue therapeutische Strategien zur Förderung der Wundheilung oder zur Bekämpfung von Fibrose und Krebs entwickeln und erproben. Insbesondere unsere neuen Erkenntnisse darüber, wie die Gewebespannung zusammen mit der TGF- β -hochregulierten Zellkontraktilität die Gewebewachstumsprozesse beeinflusst, können dazu beitragen, neue topische oder generalisierte therapeutische Strategien zu entwickeln, die die Gewebespannung und in der Folge das Wachstum und die Reifung von Gewebe in Wunden modulieren. Dank der Übertragbarkeit auf verschiedene Gerüstmaterialien ermöglichen unsere Plattformen eine Fülle von Folgeuntersuchungen.

Diese Arbeit zeigt die Bedeutung der reziproken Interaktion zwischen der ECM und den eingebetteten adhärennten Zellen. Dieses Zusammenwirken ermöglicht den schnellen Aufbau einer Wachstumsfront, bevor der zeitlich eng getaktete Übergang zur Gewebereifung und mechanischen Stabilisierung erfolgt, was zur Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität essentiell ist. Wir erwarten, dass die vorgestellten Plattformen des *de novo* gezüchteten Mikrogewebes faszinierende neue Anwendungen in der biomedizinischen Forschung erschliessen werden.