

Diss. ETH No. 27906

Microengineered Three-Dimensional, Magnetically Actuated Scaffolds and their Impact on Macrophages

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ELISE AMANDINE AEBY

MSc in Nanosciences, University of Basel

born on 03.10.1990

citizen of

Giffers FR, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dr. h.c. Viola VOGEL, examiner

Dr. Jens MÖLLER, co-examiner

Prof. Dr. Marcy ZENOBI-WONG, co-examiner

2021

Abstract

Macrophages were initially recognised for their function as phagocytes, where they fulfil important tasks in host defence and homeostasis through the clearing of pathogens and apoptotic cell debris. Macrophages can have two different sources: they were either seeded during embryogenesis and remain as a self-replicating, tissue resident population, or they originate from blood circulating monocytes and differentiate upon tissue infiltration into macrophages. Tissue macrophages have a wide array of phenotypes, whose exact cause remains unclear. In addition to their tissue-specific phenotypes, macrophages can be activated towards a pro-inflammatory or pro-healing phenotype, often referred to as M1 and M2, respectively. Misregulated macrophages were found to play a prominent role in diseases, such as, but not limited to cancer and fibrosis, which are also characterised by an alteration of the physical properties of the tissue. Great advances were made to understand the effect of soluble factors on the phenotype of the macrophages and its consequences on disease. However, the role of the environmental physical properties on the macrophages has only been studied recently. Investigating the mechanobiology of macrophages, and cells in general, requires a multidisciplinary knowledge of chemistry, engineering, or physics, which is the reason why this field was long overlooked by the immunobiology community. The effect of physical factors on macrophages was assessed in two-dimensional (2D) cell culture, where macrophages were found to respond to factors such as the roughness of or the Young's modulus of the substrate. Lately, the effect of spatial confinement in 2D was shown to reduce the late pro-inflammatory response of macrophages, and local displacements of collagen gels were shown to attract macrophages migrating on top of them. Reproducing those results acquired in a 2D environment using a three-dimensional (3D) system would give novel insights in the mechanobiology of macrophages, naturally exposed to a 3D environment *in vivo*.

Periodic stretching of the substrate was previously reported to have a pro-inflammatory effect on macrophages. Recent work by others showed that local deformations of collagen I matrices created by contractile cells or through microindentation, attracted macrophages seeded on top of the collagen I. We therefore analysed the effect of local deformation of the 3D collagen I matrix onto macrophages cultivated within them. To achieve this effect, we decided to use magnetic microparticles tethered to the collagen matrix, and actuated

through rotating magnetic fields. The use of magnetic microparticles allows the decoupling of the mechanical actuation to the biochemical factors produced by contractile cells. To create mechanical actuation, we used commercially available magnetic microparticles, which would allow other researchers to use this technique. The magnetic microparticles were subsequently passivated, and covalently tethered to the collagen network in order to effectively transfer the mechanical forces to the surrounding matrix. Most magnetic tweezer systems can produce highly controlled magnetic fields, yet the prolonged generation of magnetic field using electrical current flowing through coils can lead to overheating issues, further exacerbated through physiological temperatures used for cellular experiments. We therefore produced a simple actuating device, which could apply mechanical actuation simultaneously to a multitude of dispersed magnetic microparticles over prolonged periods. Our design is compact enough to be placed between sample and condenser lens of most commercial optical microscopes, allowing for real-time fluorescence and confocal tracking of the specimen, or can be placed in the high-humidity environment of the incubator thanks to its protective housing. Its versatility allows the application of a range of actuation functions, such as sinusoidal, pyramidal, stepper function, or could easily be further adapted to the needs of any researchers. Despite the fixed magnetic field that is generated by the magnet used in the design, we were able to apply displacement fields of increasing amplitude based on the applied magnet angle. Using this device conjointly with the presented functionalised microparticles, we could reproduce the strain response of collagen gels over 10'000 cycles, proving the suitability of this device for prolonged actuations.

Human primary macrophages were previously reported to be attracted by the local, dynamic contraction of an underlying collagen I matrix, created by fibroblasts or indentation devices. Those results are central to understand how mechanical cues can be used as a communication means between cells, and how those cues might activate macrophages towards a pro- or anti-inflammatory phenotype. While those results were shown in a 2D environment, reproducing those results in 3D were challenging as no method allowed to activate locally cells in a 3D environment. After the development of a suitable system, we could show that the observed effects stem from the actuation itself, and not from the magnetic fields or magnetic microparticles. When exposing the cells to both magnetic fields and magnetic microparticles, thus creating local displacements of the matrix, the migratory behaviour of the cells was increased in the first 30 min of the actuation, before reducing back to the migration of the control condition. Based on that observation, we tried an actuation scheme based on the alternation between mechanical actuation

and steady state. Preliminary data on the pro-inflammatory gene expression indicate an increase thereof, in accordance to 2D strain. We could therefore show that the use of inert magnetic microparticles allows for the specific actuation of cells without additional changes to the chemical make-up of their environment and induce a change to their migratory behaviour.

Diseases such as fibrosis and cancer have an altered, denser collagen network. In order to understand how dense collagen I networks impact murine cells, another group placed the cells in 3D collagen I networks of different concentrations, thus altering their density. Here, we used collagen I fibrillar networks of varying microarchitectures, produced by variation of the polymerisation parameters, thus maintaining the chemical make-up of the networks. THP-1 monocytic cells were suspended in collagen I solution prior to polymerisation, encapsulating the cells within the 3D network, and subsequently differentiated in macrophages. As previously reported using fibrosarcoma cells and collagen I supplemented with polyethylene glycol, the small pore size of the dense networks induced a reduction of the cell projected area in comparison to a loose network. 3D spatial confinement on non-activated human macrophages resulted in decreased overall pro-inflammatory priming based on the pro-inflammatory markers nuclear factor κ B and interleukin 6, while the effect of confinement on activated M1 macrophages remains inconclusive. Infiltration of monocytes into a tissue is another indication of inflammation and was thus also assessed here. We could show that dense collagen reduced the number of infiltrated monocytes, and the infiltration distance. When comparing that to the pro-inflammatory monocytes, infiltration and migration was further reduced, indicating that collagen I density has an influence on infiltration of monocytes into tissues. Those results indicate that 3D spatial confinement has similar effects to 2D spatial confinement and lay the group to understand how the environment can impact the phenotype of human macrophages.

To summarise, this thesis showed that THP-1 cells are sensitive to local mechanical actuation and change of collagen density in a 3D environment. The use of a 3D system over the conventional 2D techniques allows approaching of the *in vivo* environment. Those results lay the ground for central questions, such as the role of the local niche in the specific phenotype of tissue resident macrophages, or the role of mechanical actuation in intercellular communication.

Resumé

Les macrophages ont été initialement reconnus pour leur rôle de phagocytes, où ils remplissent des tâches importantes dans la défense de leur hôte et dans l'homéostasie en éliminant les agents pathogènes et les débris cellulaires apoptotiques. Les macrophages peuvent avoir deux origines différentes : soit ils ont été inoculés au cours de l'embryogenèse et restent une population autonome résidant dans les tissus, soit ils proviennent de monocytes circulant dans le sang et se différencient en macrophages lors de l'infiltration dans les tissus. Les macrophages tissulaires présentent un large éventail de phénotypes, dont la cause exacte reste obscure. En plus de leurs phénotypes spécifiques aux tissus, les macrophages peuvent être activés vers un phénotype pro-inflammatoire ou pro-guérison, souvent appelés M1 et M2, respectivement. On a découvert que les macrophages mal régulés jouaient un rôle important dans des maladies telles que le cancer et la fibrose, qui se caractérisent également par une altération des propriétés physiques des tissus. De grands progrès ont été réalisés pour comprendre l'effet des facteurs solubles sur le phénotype des macrophages et ses conséquences sur la maladie. Cependant, le rôle des caractéristiques physiques de l'environnement sur les macrophages n'a été étudié que récemment. L'étude de la mécanobiologie des macrophages, et des cellules en général, nécessite des connaissances multidisciplinaires en chimie, ingénierie ou physique, ce qui explique pourquoi ce domaine a longtemps été négligé par la communauté de chercheurs en immunobiologie. L'effet des facteurs physiques sur les macrophages a été évalué en culture cellulaire bidimensionnelle (2D), où l'on a constaté que les macrophages réagissaient à des facteurs tels que la rugosité ou le module de Young du substrat. Récemment, il a été démontré que l'effet du confinement spatial en 2D réduisait la réponse pro-inflammatoire tardive des macrophages, et que les déplacements locaux des gels de collagène attiraient les macrophages migrant sur leur dessus. La reproduction de ces résultats acquis dans un environnement 2D à l'aide d'un système tridimensionnel (3D) donnerait un nouvel aperçu de la mécanobiologie des macrophages, naturellement exposés à un environnement 3D *in vivo*.

On a déjà signalé que l'étirement périodique du substrat avait un effet pro-inflammatoire sur les macrophages. Des travaux récents ont montré que les déformations locales des matrices de collagène I créées par des cellules contractiles ou par microindentation at-

tiraient les macrophages ensemencés sur le collagène I. Nous avons donc analysé l'effet de la déformation locale d'une matrice 3D de collagène I sur les macrophages cultivés en son centre. Pour obtenir cet effet, nous avons décidé d'utiliser des microparticules magnétiques reliées à la matrice de collagène, et actionnées par des champs magnétiques rotatifs. L'utilisation de microparticules magnétiques permet de découpler l'actionnement mécanique des facteurs biochimiques produits par les cellules contractiles. Pour créer l'actionnement mécanique, nous avons utilisé des microparticules magnétiques disponibles dans le commerce, ce qui permettrait à d'autres chercheurs et chercheuses de reproduire cette technique. Les microparticules magnétiques ont ensuite été passivées et fixées de manière covalente au réseau de collagène afin de transférer efficacement les forces mécaniques à la matrice environnante. La plupart des systèmes de pincettes magnétiques peuvent produire des champs magnétiques hautement contrôlés, mais la génération prolongée d'un champ magnétique à l'aide d'un courant électrique circulant dans des bobines peut entraîner des problèmes de surchauffe, exacerbés par les températures physiologiques utilisées pour les expériences cellulaires. Nous avons donc produit un dispositif d'actionnement simple, capable d'appliquer simultanément une action mécanique à une multitude de microparticules magnétiques dispersées sur des périodes prolongées. Notre dispositif est suffisamment compact pour être placé entre l'échantillon et la lentille du condenseur de la plupart des microscopes optiques commerciaux, permettant d'imager le spécimen en temps réel en utilisant les canaux fluorescents, voire d'acquérir des images à haute résolution en utilisant un microscope confocal. Le dispositif peut également être placé dans l'environnement humide de l'incubateur grâce à son boîtier de protection. Sa polyvalence permet l'application d'une gamme de fonctions d'actionnement, telles que sinusoïdale, pyramidale, fonction pas à pas, ou pourrait facilement être adaptée aux besoins de tout chercheur et chercheuse. Malgré le champ magnétique fixe généré par l'aimant utilisé dans la conception, nous avons pu appliquer des champs de déplacement d'amplitude croissante en fonction de l'angle de l'aimant appliqué. En utilisant ce dispositif conjointement avec les microparticules fonctionnalisées présentées, nous avons pu reproduire la réponse de déformation des gels de collagène sur 10'000 cycles, prouvant la pertinence de ce dispositif pour des actions prolongées.

Il a déjà été signalé que les macrophages humains primaires étaient attirés par les contractions locales et dynamiques d'une matrice de collagène I sous-jacente, créées par des fibroblastes ou des dispositifs d'indentation. Ces résultats sont essentiels pour comprendre comment les signaux mécaniques peuvent être utilisés comme moyen de communication entre les cellules, et comment ces signaux peuvent activer les macrophages vers un

phénotype pro- ou anti-inflammatoire. Alors que ces résultats ont été montrés dans un environnement 2D, la reproduction de ces résultats en 3D était un véritable casse-tête, car aucune méthode ne permettait d'activer localement les cellules dans un environnement 3D. Après le développement d'un système approprié, nous avons pu montrer que les effets observés proviennent de l'activation elle-même, et non des champs magnétiques ou des microparticules magnétiques. En exposant les cellules à la fois aux champs magnétiques et aux microparticules magnétiques, créant ainsi des déplacements locaux de la matrice, le comportement migratoire des cellules a augmenté dans les 30 premières minutes de l'activation, avant de revenir à la migration de la condition de contrôle. Sur la base de cette observation, nous avons essayé un schéma d'actionnement basé sur l'alternance entre l'actionnement mécanique et l'état stable. Les données préliminaires sur l'expression des gènes pro-inflammatoires indiquent une augmentation de celle-ci, en accord avec les observations en 2D. Nous avons donc pu montrer que l'utilisation de microparticules magnétiques inertes permet l'activation spécifique de cellules sans modification supplémentaire de la composition chimique de leur environnement et induit une modification de leur comportement migratoire.

Les maladies telles que la fibrose et le cancer présentent un réseau de collagène altéré et plus dense. Afin de comprendre l'impact des réseaux de collagène I denses sur les cellules de souris, un autre groupe a placé les cellules dans des réseaux 3D de collagène I de différentes concentrations, modifiant ainsi leur densité. Ici, nous avons utilisé des réseaux fibrillaires de collagène I de microarchitectures différentes, produits par variation des paramètres de polymérisation, ce qui permet de conserver la composition chimique des réseaux. Des cellules monocytaires THP-1 ont été mises en suspension dans une solution de collagène I avant la polymérisation, encapsulant les cellules dans le réseau 3D, puis ont été différenciées en macrophages. Comme cela a été précédemment décrit en utilisant des cellules de fibrosarcome et du collagène I mélangé à du polyéthylène glycol, la petite taille des pores des réseaux denses a entraîné une réduction de la surface projetée des cellules par rapport à un réseau lâche. Le confinement spatial en 3D sur des macrophages humains non activés a entraîné une diminution de l'amorçage pro-inflammatoire global basé sur les marqueurs pro-inflammatoires que sont le facteur nucléaire κ B et l'interleukine 6, tandis que l'effet du confinement sur les macrophages M1 activés reste peu concluant. L'infiltration de monocytes dans un tissu est une autre indication de l'inflammation et a donc également été évaluée ici. Nous avons pu montrer que le collagène dense réduisait le nombre de monocytes infiltrés, ainsi que la distance d'infiltration. En comparant cela aux monocytes pro-inflammatoires, l'infiltration et la migration étaient encore plus réduites,

indiquant que la densité du collagène I a une influence sur l'infiltration des monocytes dans les tissus. Ces résultats indiquent que le confinement spatial en 3D a des effets semblables au confinement spatial en 2D et permettent au groupe de comprendre comment l'environnement peut avoir un impact sur le phénotype des macrophages humains.

En résumé, cette thèse a montré que les cellules THP-1 sont sensibles à l'action mécanique locale et au changement de la densité du collagène dans un environnement 3D. L'utilisation d'un système 3D par rapport aux techniques 2D conventionnelles permet de s'approcher de leur environnement *in vivo*. Ces résultats ouvrent la voie à des questions centrales, telles que le rôle de la niche locale dans le phénotype spécifique des macrophages résidents des tissus, ou le rôle de l'actionnement mécanique dans la communication intercellulaire.