

DISS. ETH NO. 21108

# **Engineering Chondrogenic Micro- Environments for Tissue Engineering Applications**

**DISSERTATION**

Submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

**DOCTOR OF SCIENCES**

by

Rami Mhanna

M. Eng., Biomedical Eng., The University of Melbourne

born May 5th, 1982

Lebanese

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Marcy Zenobi-Wong, examiner

Dr. Daniel Eberli, co-examiner

Prof. Dr. Ivan Martin, co-examiner

2013

# Abstract

Mature articular cartilage has very limited ability to self-repair after injury or disease. In autologous chondrocyte implantation procedures (ACI), chondrocytes are cultured on tissue culture plastic where they undergo dedifferentiation assuming a fibroblast-like phenotype and gene expression profile. Dedifferentiated chondrocytes re-express cartilage specific genes when cultured in materials like alginate hydrogels which induce a round morphology. The cellular microenvironment plays a crucial role in directing proliferation, adhesion, metabolic and catabolic activities of cells. Cells interact with their microenvironment via membrane receptors that recognize changes in the extracellular matrix (ECM), oxygen levels, mechanical stimuli and small molecules. The aim of this thesis was to engineer 2D and 3D microenvironments which will improve conditions for cartilage tissue engineering applications such as ACI. To achieve this goal we applied the layer-by-layer technique to optimize chondrocyte culture conditions in 2D substrates and prevent dedifferentiation. We then worked on designing biomimetic microenvironments by incorporating cartilage-specific molecules into 3D scaffolds. The scaffolds developed in this thesis could restore the cartilage phenotype of dedifferentiated chondrocytes or induce chondrogenic differentiation of stem cells while enhancing cell proliferation. Finally, we investigated the microenvironment conditions (mechanical load, oxygen tension and stiffness) which promote expression of superficial zone protein (SZP), a key protein in cartilage lubrication.

With the use of the layer-by-layer technique we were able to prepare natural ECM-based films made of type I collagen (Col1)/chondroitin sulfate (CS) or Col1/Heparin (HN) on stretchable polydimethylsiloxane (PDMS) substrates. The Col1/CS films were stable in media while Col1/HN films were not. Preliminary studies showed that chondrocytes did not restore the expression of cartilage markers when grown on these films which indicates that a 3D environment is probably more important to maintain the cartilage phenotype than the interaction with ECM molecules.

Given the results of the 2D system, the focus of the thesis shifted to engineered 3D microenvironments. We observed that sulfation of alginate induced cell proliferation while maintaining the chondrogenic phenotype of encapsulated chondrocytes. Remarkably, alginate sulfate hydrogels showed a cartilage-like, opaque appearance after 5 weeks in culture whereas the unmodified alginate samples remained translucent. The problems associated with limited availability of healthy early passage chondrocytes drives the work towards using human mesenchymal stem cells (hMSCs) for repair. We therefore studied the possibility of inducing chondrogenesis of hMSCs using a bio-inspired hydrogel. Interactions of MSCs with the triple helical collagen mimetic, GPC(GPP)<sub>5</sub>-GFOGER-(GPP)<sub>5</sub>GPC-NH<sub>2</sub>, and the fibronectin adhesion peptide, RGD, were studied in degradable or non-degradable PEG gels. GFOGER-modified degradable gels induced the highest cell proliferation and were the most chondrogenic of the investigated conditions. Finally we studied the *in-vitro* conditions which promote expression of the superficial zone marker SZP. We observed that bovine chondrocytes in monolayer showed a drastic decrease in SZP expression, similar in trend to the commonly reported downregulation of Col2. Chondrocytes embedded in alginate beads for 4 days re-expressed SZP but not Col2. Cyclic mechanical strain and normoxic conditions upregulated SZP expression whereas Col2 expression was upregulated only in alginate beads under hypoxic conditions. This work suggests that the distribution of environmental signals in the different zones of cartilage *in-vivo* is responsible for the layer-specific distribution of matrix proteins throughout the thickness of articular cartilage.

To conclude, the cell microenvironment can be engineered to induce cell proliferation, maintain the cartilage phenotype of chondrocytes, regulate expression of cartilage zonal markers and promote chondrogenic differentiation of stem cells. The results of this thesis provide insight into several crucial aspects of the microenvironment and should lead the way to the discovery and application of novel promising materials, such as alginate sulfate derivatives, which could transform current treatment strategies for repair and regeneration of cartilage lesions.

# Riassunto

La cartilagine articolare matura ha una capacità molto limitata di autorinnovamento in seguito a lesioni o malattie. Nelle procedure d'impianto di condrociti autologhi (ACI), i condrociti sono solitamente coltivati in fiasche di plastica per colture cellulari in cui vanno incontro a de-differenziamento, assumendo un fenotipo e un profilo di espressione genica, tipici dei fibroblasti. I condrociti de-differenziati ri-esprimono geni specifici della cartilagine quando coltivati in materiali come idrogel di alginato che inducono una morfologia rotondeggiante. Il microambiente cellulare gioca un ruolo cruciale nel dirigere proliferazione, adesione, e attività metaboliche e cataboliche delle cellule. Queste ultime interagiscono infatti con il microambiente circostante attraverso recettori di membrana che riconoscono cambiamenti nella matrice extracellulare (ECM), nei livelli di ossigeno, stimoli meccanici e piccole molecole. Lo scopo di questa tesi è stato quello di ingegnerizzare microambienti in 2D e 3D che potessero migliorare le condizioni per applicazioni d'ingegneria tissutale della cartilagine come l'ACI. Per raggiungere tale obiettivo, abbiamo innanzitutto utilizzato la tecnica "layer-by-layer" che ha permesso di ottimizzare le condizioni di coltura dei condrociti in substrati 2D e al tempo stesso prevenirne il de-differenziamento. In seguito abbiamo lavorato alla progettazione di materiali bio-mimetici in cui molecole specifiche della cartilagine fossero incorporate in scaffold 3D. Gli scaffold sviluppati in questa tesi potrebbero essere utili per ristabilire il fenotipo cartilagineo dei condrociti de-differenziati o indurre il differenziamento condrogenico di cellule staminali, aumentando al tempo stesso la proliferazione cellulare. Infine abbiamo investigato le condizioni del microambiente (carico meccanico, tensione di ossigeno e rigidità) che promuovessero l'espressione della "proteina della zona superficiale" (SZP), una proteina chiave nella lubrificazione della cartilagine.

Con l'uso della tecnica "layer-by-layer" abbiamo preparato dei film basati sulla matrice extracellulare naturale e contenenti collagene di tipo I (Col1)/condroitin solfato (CS) o Col1/eparina (HN) su substrati estensibili di polidimetilsilossano (PDMS). Tra i due tipi di film, solo quelli contenenti Col1/CS si sono rivelati stabili nel terreno di

coltura. Studi preliminari hanno dimostrato che i condrociti non erano capaci di ripristinare l'espressione di marcatori della cartilagine se cresciuti su questi film. Tal evidenza sperimentale indica che un ambiente tridimensionale è probabilmente più importante dell'interazione con le molecole della matrice extracellulare, al fine di mantenere il fenotipo cartilagineo.

Dati i risultati del sistema bidimensionale, abbiamo rivolto l'attenzione verso l'ingegnerizzazione di microambienti in 3D. Abbiamo osservato che la solfatazione di alginato promuoveva proliferazione cellulare, mantenendo al tempo stesso il fenotipo condrogenico di condrociti incapsulati. Sorprendentemente gli idrogel di alginato solfato assumevano un aspetto opaco simile alla cartilagine dopo 5 settimane in coltura mentre i campioni di alginato non modificato rimanevano traslucidi. I problemi associati alla disponibilità limitata di condrociti sani a passaggio precoce indirizza il lavoro verso l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) per la rigenerazione. Di conseguenza abbiamo studiato la possibilità di indurre la condrogenesi di cellule hMSCs usando un idrogel bio-ispirato. In particolare, abbiamo investigato le interazioni di hMSCs con un peptide che mima il collagene a tripla elica, GPC(GPP)5-GFOGER-(GPP)5GPC-NH<sub>2</sub>, e con un peptide di adesione tipico della fibronectina, RGD, all'interno di gel di polietilenglicole (PEG), degradabili e non. Tra le condizioni prese in esame, i gel contenenti il peptide GFOGER e degradabili si sono rivelati i migliori sia per l'induzione di proliferazione cellulare che per la condrogenesi.

Infine, abbiamo condotto uno studio per identificare le condizioni *in vitro* che promuovessero l'espressione di SZP, il marcatore della zona superficiale della cartilagine. A tale proposito, abbiamo osservato che i condrociti bovini cresciuti come mono-strato mostravano una notevole diminuzione nell'espressione di SZP, con una tendenza simile alla riduzione di Col2 comunemente riportata. Condrociti incorporati in perline di alginato per 4 giorni ri-esprimevano SZP ma non Col2. Una sollecitazione meccanica ciclica e condizioni di normossia inducevano l'espressione di SZP mentre l'espressione di Col2 risultava aumentata solo in perline di alginato mantenute in ipossia. Questo lavoro suggerisce che la distribuzione strato-specifica di proteine della matrice attraverso lo spessore della cartilagine articolare.

In conclusione, il microambiente cellulare può essere ingegnerizzato per indurre proliferazione cellulare, mantenere il fenotipo cartilagineo, regolare l'espressione di marcatori specifici delle diverse zone della cartilagine e promuovere il differenziamento condrogenico delle cellule staminali. I risultati di questa tesi hanno permesso la comprensione di diversi aspetti cruciali del microambiente e aprono la strada alla scoperta e l'applicazione di nuovi materiali ideali per l'ingegneria tissutale della cartilagine come l'alginato solfato.