



Doctoral Thesis

Mechanobiology of cell migration in three dimensions PEG-based model systems for investigation of protease- dependent behavior

Author(s):

Raeber, Georg

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004930882> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**Mechanobiology of cell migration in
three dimensions:**

**PEG-based model systems for investigation of
protease-dependent behavior**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

Georg Raeber

Dipl. Masch.-Ing. ETH
born August 11, 1972
citizen of Zurich, ZH

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Jeffrey A. Hubbell, examiner
Prof. Dr. Ralph Müller, co-examiner

Summary

Cell migration is a molecularly integrated physical process indispensable for tissue development, homeostasis, and regeneration and plays a key role in many diseases. Mechanobiological interactions between cells and extracellular matrix (ECM) are fundamental in these phenomena. Cells actively probe the biophysical properties of their environment while migrating and use the resulting information to direct their movement. However, the molecular mechanisms involved are only partially understood and the quantitative measurement of migration under controlled biophysical conditions is, therefore, of considerable interest in cell biology and clinical research. The complexity encountered *in vivo* has motivated the design of *in vitro* model systems to study diverse aspects of cell migration. Elaborate systems make use of biopolymers like collagen or fibrin to mimic the natural three-dimensional (3D) microenvironment. Nevertheless, the limited engineering freedom of these materials demands for new approaches and has inspired the use of synthetic poly(ethylene glycol) (PEG) hydrogels as model matrices in this work. These materials permit the systematic reconstitution of a microenvironment on a molecular level.

This thesis developed hardware and software tools that integrated with synthetic PEG hydrogels to constitute a model system for the quantitative *in vitro* investigation of mechanobiological considerations in 3D cell migration. The system design was based on time-lapse microscopy and a persistent random walk model and allowed the investigation of single cell migration as function of static or dynamic matrix mechanics. The quantitative comparison of migration parameters for dermal fibroblast in collagen, fibrin and PEG matrices revealed the importance of the environment's microarchitecture in cell migration. It was demonstrated that the synthetic hydrogels offered a more sensitive model system for correlating cellular matrix metalloproteinase (MMP) levels with migratory behavior than biopolymers and justified the decision to focus in further investigations on PEG hydrogels as matrix model.

Over longer culture periods, fibroblasts were able to form interconnected cellular networks without extensive bulk degradation of uninvaded PEG hydrogel volume. Thus, the synthetic hydrogels responded localized to pericellular proteolysis enabling coordinated migration and complex morphogenesis. It was shown that these processes depended on tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 but not TIMP-1 suggesting a possible involvement of membrane-type-1 MMP in migration. Furthermore, the developed tools for migration analysis proved suitable for quantitative determination of basic principles of cell-cell communication necessary for morphogenesis.

The specificity and indispensability of the biological signals incorporated in the synthetic matrix was further investigated *in vitro* and *in vivo*. PEG hydrogels lacking cell adhesion sites or insusceptible to cell-secreted proteases did not permit cell spreading and migration *in vitro* and were completely devoid of cellular infiltration *in vivo*. In contrast, MMP-sensitive, RGD-containing, and vascular endothelial growth factor (VEGF)-releasing hydrogel implants induced complete remodeling and extensive neovascularization. This study substantiated the capacity of the engineered matrix to induce morphogenesis-like remodeling by being responsive to cellular signals.

To extend the capabilities of the model system developed so far, an uniaxial cell stimulation device (UCSD) was designed and tested. The UCSD enabled user-defined displacement waveforms to be applied to 3D PEG hydrogel constructs during the acquisition of time-lapse sequences. Thus, the dynamic response of cell migration parameters to externally applied stretch could be analyzed. Benefiting from the Hookean properties at physiological frequencies

(<10 Hz) of PEG hydrogels, the local strain field within the constructs was estimated by finite element analysis. Two prototypical stimulation regimes were tested and suggested that mechanical stimulation promoted proteolytic migration of fibroblasts in the direction of principle strain.

In the last part of this work, the developed model system was used to address the clinically relevant topic of smooth muscle cell (SMC) migration. SMC migration is recognized as a key event in the development of atherosclerosis as well as in restenosis after balloon angioplasty. Mechanobiological cues are believed to participate in the onset of these pathologies. Two SMC phenotypes have been described, rhomboid-shaped (R-) and spindle-shaped (S-)SMCs. A set of three PEG matrices with different elastic moduli but very similar chemical properties was synthesized. In combination with zymographic techniques, Western blot, and quantitative migration analysis, this material set enabled testing the hypothesis that the proteolytic machinery and the migratory behavior of R- and S-SMCs is differentially regulated by the mechanical properties of the microenvironment. It was demonstrated that a subtle increase in the elastic modulus of the matrix led only in the synthetic phenotype to a coordinated downregulation in the serine proteinases and a decrease in migration, whereas the contractile phenotype was insusceptible to biophysical changes in the environment. To our knowledge, these findings show for the first time a phenotypic difference in enzyme activity of R- and S-SMCs that was solely induced by differences in the mechanical microenvironment. This study encourages further investigations of the phenotypic differences in the mechanobiology of SMCs with highly controlled model systems as presented in this work.

In conclusion, an elaborate model system was developed that permitted the clear-cut investigation of the isolated influence the matrix mechanics exerts on cell migration in a 3D environment.

Zusammenfassung

Zellmigration ist ein auf molekularer Ebene integrierter physikalischer Prozess, welcher in der Entwicklung, der Erhaltung und der Regeneration von Geweben eine unentbehrliche Rolle spielt sowie für viele Krankheiten von Bedeutung ist. Mechanisch-biologische Wechselwirkungen zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix (ECM) sind für diese Phänomene entscheidend. Die lokalen biophysikalischen Eigenschaften der ECM werden von Zellen während der Migration wahrgenommen und sind mitbestimmend für ihre Bewegungsrichtung. Die molekularen Prozesse, welche sich dabei abspielen, sind jedoch nur teilweise bekannt. Deshalb ist die quantitative Messung von Zellmigration in der biologischen wie auch in der klinischen Forschung von grossem Interesse. Die Komplexität solcher Messungen *in vivo* haben die Entwicklung von *in vitro* Modellsystemen motiviert, welche Biopolymere wie Kollagen oder Fibrin verwenden, um die drei-dimensionale (3D) *in vivo* Umgebung nachzubilden. Die eingeschränkte Möglichkeit systematischer Veränderung von Zusammensetzung oder Struktur in Biopolymeren verlangt jedoch nach neuen Materialien und begründet den Einsatz von synthetischen Poly(ethylenglykol) (PEG)-Hydrogelen in dieser Arbeit, welche eine grosse molekulare Gestaltungsfreiheit besitzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Apparaturen und Programme entwickelt, die gemeinsam mit PEG-Hydrogelen ein Modellsystem bilden, welches die quantitative *in vitro* Untersuchung von mechanisch-biologischen Einflüssen auf die Zellmigration ermöglicht. Das System basiert auf einem time-lapse Mikroskop, behandelt die Zellmigration als eine persistente Zufallsbewegung und besitzt die Möglichkeit, die mechanische Umgebung der Zellen dynamisch zu verändern. Die Analyse von Migrationsparametern vereinzelter dermaler Fibroblasten in Kollagen, Fibrin und PEG-Hydrogelen zeigte die Wichtigkeit der Mikroarchitektur der Matrix auf und wies die synthetischen Hydrogele als die sensitivste Modellumgebung aus, welche eine Korrelation zwischen Migration und ausgeschiedenen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zulies. Dieses Ergebnis begründete die Entscheidung, weitere Untersuchungen ausschliesslich mit PEG-Hydrogel durchzuführen.

Fibroblasten, welche über eine längere Zeitdauer in den synthetischen Gelen kultiviert wurden, bildeten ein zusammenhängendes, zelluläres Netzwerk, welches das Hydrogel vollständig durchdrang, ohne jedoch den nicht invadierten Teil zu degradieren. Diese Beobachtung liess auf sehr kontrollierte, lokale Degradationsvorgänge schliessen, welche für morphogenetische Abläufe unabdingbar sind. Es konnte gezeigt werden, dass diese Prozesse sensitiv auf MMP-Inhibitor (TIMP)-2, nicht aber auf TIMP-1 reagierten und somit eine Beteiligung von membrangebundenem MMP-1 (MT1-MMP) sehr wahrscheinlich erscheinen lassen. Zusätzlich erwiesen sich die entwickelten Migrationsanalyse-Algorithmen als geeignet, grundlegende Zell-Zell Interaktionen zu quantifizieren, die während der Entstehung von Vielzellstrukturen höherer Ordnung eine entscheidende Rolle spielen.

Die Unerlässlichkeit spezifischer, in die Hydrogele eingebauter biologischer Signalpeptide wurden weitergehend mittels *in vitro* und *in vivo* Versuchen ermittelt. PEG-Hydrogele, welche keine Integrin-Liganden aufwiesen oder nicht enzymatisch degradierbar waren verhinderten Zellmigration *in vitro* und Zellinvasion *in vivo* vollständig. MMP-abbaubare, RGD-präsentierende und vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren-freisetzende Hydrogele hingegen induzierten den kompletten Umbau der subkutanen Implantate und begünstigten die Gefässneubildung. Diese Studie untermauerte die einzigartigen Materialeigenschaften der Hydrogele, welche durch das Ansprechen auf zelluläre Signale morphogenetische Vorgänge ermöglichen.

Um das Einsatzspektrum des Modellsystemes zu erweitern, wurde eine uniaxiale Zellstimulationseinrichtung (UCSD) entworfen, gefertigt und getestet. Die UCSD überträgt benutzerdefinierte Stimulationszyklen auf Zellen in Hydrogelkonstrukten, während gleichzeitig Bildsequenzen aufgenommen werden, wodurch das dynamische Migrationsverhalten von Zellen analysiert werden kann. PEG-Hydrogele zeigen bei physiologisch relevanten Frequenzen (<10 Hz) ein nahezu lineares elastisches Materialverhalten, was die Abschätzung lokaler Dehnungen mittels der Finite-Elemente-Methode ermöglichte. Zwei prototypische Stimulationszyklen wurden getestet und zeigten, dass mechanische Stimulation die proteolytische Migration von dermalen Fibroblasten entlang von Hauptdehnungslinien auslöste.

Im letzten Teil der Arbeit wurde das neu entwickelte Modellsystem auf ein klinisch relevantes Problem angewandt: die Migration von glatten Muskelzellen (SMCs), die in zwei Phänotypen auftreten (R- und S-SMCs). SMC-Migration gilt als Schlüsselereignis während der Entwicklung von Arteriosklerose oder der Restenosierung nach einer Angioplastie. Mechanischen Signalen wird eine entscheidende Bedeutung in diesen Prozessen zugeschrieben. Eine Gruppe von drei PEG Hydrogelen mit beinahe identischen chemischen, aber unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften wurde entwickelt, um mit Hilfe biochemischer Methoden und quantitativer Migrationsmessung die Aktivität zellulärer Enzyme mit dem Migrationsverhalten der beiden SMC-Phänotypen als Funktion der mechanischen Eigenschaften der Hydrogele zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des E-Modules zu einer Verminderung der Enzymaktivität im fibrinolytischen System von R-SMCs führte, welche mit einer Verringerung der Migration einher ging. S-SMCs reagierten bedeutend weniger auf Änderungen in ihrem mechanischen Umfeld. Diese Studie zeigte nach unserem Wissen zum ersten Mal einen phänotypischen Unterschied in der Enzymaktivität von R- und S-SMCs auf, welcher durch die mechanischen Eigenschaften der umgebenden Matrix induziert wurde.