

Micro- and nanoengineering the 3-dimensional environment of cells in culture

Doctoral Thesis

Author(s):

Dusseiller, Marc Robert

Publication date:

2006

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005206909>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO. 16433

**MICRO- AND NANOENGINEERING THE
3-DIMENSIONAL ENVIRONMENT OF
CELLS IN CULTURE**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
MARC ROBERT DUSSEILLER

Diploma in Material Science (Swiss Federal Institute of Technology Zurich)
2001

born 4.11.1975

citizen of Meinier (GE)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Marcus Textor, examiner
Prof. Dr. Jeffrey Hubbell, co-examiner
Prof. Dr. Viola Vogel, co-examiner

2005

ABSTRACT

Tissue function is modulated by an intricate 3-D architecture of cells and biomolecules on a micro- and nanometer scale. Biomedical research has become increasingly aware of the limitations of time-honored conventional 2-D tissue cell cultures where most tissue cell studies have been carried out. They are now searching for 3-D cell culture systems, something between a Petri-dish and a mouse.

The behavior of cells in culture is influenced by a variety of cues from the microenvironment, such as the media condition (pH, temperature, growth factors, nutrients), binding to extracellular matrix components, binding to other cells, the mechanical properties of their surrounding and forces acting on the cells which will influence their shape. The question of how shape and function are interrelated has been a fundamental issue of biology for the last two millennia.

In the scope of this thesis we have developed platform technologies which enable the control of many aspects of the microenvironment of single cells, taking into account their intrinsic 3-D nature and controlling their 3-D shape. We have developed a set of replication techniques, starting from microfabricated Si using standard techniques from the microelectronics field, to produce surfaces exhibiting arrays of microstructures of the dimensions of single cells. Various materials (Thermoplastic polymers (polystyrene), elastomers (poly(dimethyl siloxane)) and hydrogels (poly(ethylene glycol)) with different bulk properties (different mechanical, optical and diffusive properties) have been successfully produced in a consistent manner using processes which can be performed without the use of expensive equipment, such as hot-embossing, molding and casting. Furthermore, we have investigated and developed techniques which allow to selectively functionalize different areas of the topographically structured surfaces. To restrict adhesion of cells between the microstructures a *graft*-co-polymer that consists of a poly(L-lysine) (PLL) backbone and multiple PEG side chains (PLL-*g*-PEG), which renders the surface resistant to the unspecific adhesion of proteins, was printed onto the plateau surface by the means of a wet inverted printing method using a hydrogel containing freely diffusion PLL-*g*-PEG.

The μ 3-D cell culturing concept was then further applied to address a number of fundamental biological questions and shown to be a unique way to decouple the effects of cell shape and spreading, cell-cell contact and adhesion to a 3-D environment. Furthermore we have developed the system to enable high-resolution 3-D imaging for both fixed and live cells. We have observed first signs of autonomous polarization of single epithelial cells (MDCKs) when grown inside microwells mimicking the shape of cells as only achieved when grown as dense monolayer. We have also investigated the role of 3-D adhesion of primary human endothelial cells (HUVECs) and mouse fibroblast-like cells (3T3s) on their ability to assemble a fibronectin matrix. By the use of different shapes of microwells we have shown the possible control of fibrillogenesis by the cell shape. Although the biological work has not yet been statistically conclusive we have shown the feasibility of the μ 3-D concept to address these questions.

In addition to the culturing of cells on surfaces, we have also developed microfluidic devices, which might be important for the integration of micro array cell cultures into automatized microdevices. We have shown the heterogenous patterning of biomolecules, such as proteins and lipid vesicles by the combination of crossed microfluidic channels, a prepatterned surface and a two-step surface functionalization.

The technologies developed in this thesis are believed to have a fundamental impact on *in-vitro* biological experiments and can be further applied as models for high-throughput drug testing, the analysis of disease development or finally to construct biohybrid devices and tissue engineering at the microscale.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Funktion von lebendem Gewebe wird durch eine komplexe 3-D Architektur der beteiligten Zellen und Biomolekülen auf allen Längenskalen (Mikro- und Nanometer) bestimmt. In der biomedizinischen Forschung wurde man sich in zunehmendem Masse bewußt, dass herkömmliche 2-D Gewebezellkulturen, in denen die meisten Studien durchgeführt werden, nur beschränkt der natürlichen Struktur von Zellen gerecht werden. Daher werden 3-D Zellkultursysteme gesucht, komplexere Modelle die zwischen Petri-Schale und Maus liegen.

Das Verhalten von Zellen in Kultur wird durch eine Vielzahl von Eigenschaften des Mikroumfelds beeinflusst. Dazu gehören die Eigenschaften des Nährmediums (pH, Temperatur, Wachstumsfaktoren, Nährstoffe), die Adhäsion an Bestandteile der extrazellulären Matrix, der Kontakt mit benachbarten Zellen, die mechanischen Eigenschaften der Umgebung und die Kräfte, die auf den Zellen wirken. Letztere bestimmen schlussendlich die Form der Zellen. Die Frage über den Zusammenhang von Form und Funktion ist von grundlegender Bedeutung und beschäftigt seit mehr als zweitausend Jahren eine Vielzahl von Wissenschaftlern.

Im Umfang dieser Dissertation wurden Plattformtechnologien entwickelt, mit dem Ziel, eine Vielzahl der Eigenschaften des Mikroumfelds einzelner Zellen gezielt zu steuern und gleichzeitig die natürliche 3-D Form der Zellen zu erhalten. Es wurden verschiedene Replikationstechniken von mikrostrukturiertem Silizium entwickelt, um Oberflächen zu produzieren, die angeordnete Mikrostrukturen (*arrays*, eng.) in der Dimension einzelner Zellen aufweisen. Verschiedene strukturierte Materialien (thermoplastische Kunststoffe (Polystyrol), Elastomere (Poly(dimethyl Siloxan)) und Hydrogele (Poly(ethylene Glykol))), mit unterschiedlichen mechanischen, optischen und diffusiven Eigenschaften wurden erfolgreich und in einer konsistenten Qualität repliziert. Um auf den Gebrauch von kostspieligen Geräten der Mikrofabrikation verzichten zu können, wurden einfache Prozesse verwendet; Heiss-Prägen und Abformen durch Giessen. Weiters wurden Techniken entwickelt, die eine selektive Funktionalisierung der Oberfläche zwischen den Mikrostrukturen ermöglichen. Um die Adhäsion der Zellen zwischen den Mikrostrukturen zu verhindern wurde ein *graft-*

Co-Polymer verwendet, das aus einem Poly(L-lysine) (PLL) Rückgrat und mehrfachen Poly(ethylene Glykol) Seitenketten besteht (PLL-g-PEG). PLL-g-PEG reduziert die unspezifische Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche. Basierend auf einem hydrierten Stempelmaterial, welches als Reservoir für frei bewegliches PLL-g-PEG fungiert, wurde eine neue Druckmethode entwickelt. Da die Geometrie des Kontaktes durch die Topographie des Substrates definiert ist, konnte dazu ein flacher Stempel benutzt werden. In einem zweiten Schritt konnte die ungestempelte innere Oberfläche der Mikrostrukturen adhäsiv für Zellen gemacht werden. Entweder durch die Adsorption von Proteinen oder durch Anlagerung von funktionalisierten PLL-g-PEG Molekülen, welche eine spezifische Interaktion mit Zellrezeptoren aufweisen. Die Technik erfordert jedoch eine weitere Optimierung der Homogenität in der gestempelten Fläche und eine bessere Reproduzierbarkeit.

Das μ 3-D Zellkulturkonzept wurde getestet um verschiedene grundlegende biologische Fragen in einer neuartigen Weise anzugehen. Die Einflüsse der Zellform, des Ausbreitens der Zelle, des Zell-Zell Kontaktes und der Adhäsion an ein 3-D Umfeld können somit separiert untersucht werden. Ausserdem wurde das μ 3-D Zellkultursystem optimiert, um eine hochauflösende 3-D Mikroskopie von fixierten und lebenden Zellen zu ermöglichen. Bei einzelnen Epithelzellen (MDCKs), die in Mikrostrukturen wuchsen, welche die Form der Zellen so nachahmen wie sie üblicherweise nur in dicht zusammengewachsenen Monoschichten aufweisen, wurden Anzeichen von autonomer Polarisation beobachtet. Zusätzlich haben wir in primären menschlichen Endothelzellen (HUVECs) und Fibroblast-artigen Mauseellen (3T3s) den Effekt ihres 3-D Adhäsionszustandes auf ihre Fähigkeit, eine Fibronectin Matrix aufzubauen untersucht. Durch Mikrostrukturen unterschiedlicher Form haben wir den Einfluss der Zellform auf die Fibrillogenese festgestellt. Es handelt sich hierbei allerdings um Tendenzen, da der biologische Teil der Arbeit noch nicht statistisch aussagekräftig untersucht worden ist. Die Arbeit zeigt aber, dass das μ 3-D Konzept auf diese Fragestellungen angewendet werden kann.

Zusätzlich zum Züchten von Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen, wurde eine Mikrofluidik Technik entwickelt, die für die Integration, Miniaturisierung und Automatisierung der Zellkulturen von Bedeutung sein könnte. Durch die Kombination von gekreuzten Mikrofluidikkanälen, vorstrukturierten Oberflächen und einer zweistufigen Oberflächenmodifikation, wurden heterogene Oberflächenstrukturierungen mit Biomolekülen, wie zum Beispiel Proteinen und

Lipidvesikeln, produziert. Die Technologien, welche in dieser Dissertation vorgestellt werden, ermöglichen eine Optimierung biologischer Experimente *in-vitro*. Mögliche Anwendungsbeispiele sind Modellsysteme zur Entwicklung von neuen Medikamenten, die Entwicklung von biologischen Hybridmaschinen oder von funktionalem Gewebe, das auf der Mikroskala gezüchtet wird.