



Doctoral Thesis

Engineering cell behavior adding dimensionality to the cell sensory toolbox

Author(s):

Ochsner, Mirjam

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005905903> →

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](#).

DISS. ETH NO. 18390

ENGINEERING CELL BEHAVIOR: ADDING
DIMENSIONALITY TO THE CELL SENSORY
TOOLBOX

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

MIRJAM OCHSNER

Dipl. Werkstoff-Ing. ETH

born on February 10, 1978

citizen of Einsiedeln (SZ)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Marcus Textor, examiner

Prof. Dr. Viola Vogel, co-examiner

Prof. Dr. Matthias Lutolf, external co-examiner

Prof. Dr. Michael Smith, external co-examiner

2009

Tissue function is the summation of cell responses and therefore closely coupled to the stimuli the cell experiences in its microenvironment. In addition to substrate rigidity, matrix composition, and cell shape, dimensionality is now considered an important physical property of the cell's microenvironment which directs cell behavior. Studies have shown differences in cell behavior when cells are cultured in a three-dimensional (3-D) matrix, in comparison to cells cultured on flat surfaces. Therefore, next to the physical and chemical microenvironment, the structural environment of a cell plays a crucial role in its shape and function.

Microwell fabrication

The merger of microfabrication and cell biology has led to a variety of new tools to investigate the behavior of cells when cultured *in vitro*. However, available tools for the study of cell behavior in two-dimensional (2-D) versus 3-D environments are difficult to compare. Current 3-D models, such as gels or fibrous networks, provide no 3-D shape control of individual cells and are often difficult to combine with high-resolution microscopy imaging, such as confocal laser scanning microscope (CLSM). M. Dusseiller, M. Smith, V. Vogel, and M. Textor at ETH Zurich have developed a set of tools which combines 2-D chemical patterning with topographical microstructuring, thus presenting to the cells a structurally and biochemically defined, reductionist microenvironment. The technique combines master fabrication in silicon and replication techniques which allows us to create polydimethylsiloxane (PDMS) chips that display defined microwells of various shapes with dimensions in the order of single cells. By making use of different cross-linking densities of the PDMS substrate, tailoring of the mechanical properties of the material surrounding a cell becomes possible.

In addition to geometry, we were also able to control the chemistry of the micro-environment such that the surface inside the wells presented specific chemical functionality, *e.g.* adhesion proteins, while the plateau surface between the wells is passivated against non-specific protein adsorption and cell adhesion. The passivation is critical to ensure cells adhere only within the microwells and thereby within a controlled micro-environment. Therefore, Dusseiller *et al.* have developed a method for the wet-printing of a protein resistant graft-co-polymer, poly(L-lysine)-*g*-poly(ethylene glycol) (PLL-*g*-PEG) using an inverted microcontact printing approach. In view of the promising potential of this culture technique, the work of this thesis has been to further optimize and develop more advanced chemical modification tools of the microwells as well as to answer a number of fundamental questions as to how cells respond to variations of microenvironmental parameters, individually and in concert.

Presentation of a mobile E-cadherin coating inside microwells

As many proteins of interest in cell studies are membrane proteins, wherein mobility may play an important role, a new methodology to coat the inside of the wells with supported phospholipid bilayers (SPB) functionalized with human E-cadherin was developed in this thesis. Characterization of mobility revealed that SPBs were mobile on an oxidized PDMS surface and that the edges of the microwells did not limit the lateral diffusion of the lipids. The selection of a phospholipid with a liquid-gel transition temperature, T_M , of 35 °C meant the mobility within the microwell could be manipulated through adjusting the temperature of the environment within a small temperature range. The combination of the microwell structure with the mobile and immobile SPB provides a new tool for the study of membrane protein clustering and actin organization in well controlled 3-D environments. First preliminary experiments with Chinese hamster ovary (CHO) cells demonstrated that cells were able to adhere inside E-cadherin-functionalized SPB microwells, and furthermore, that mobility influenced actin organization of the cell in 2-D and therefore impacted cell behavior in general.

Microwells with heterogeneous display of proteins

In vivo, adhesion molecules often have tightly controlled spatial patterns, for example in epithelial cells which have cell-cell contacts laterally and basement membrane underneath the cell. Therefore, in addition to a homogeneous coating inside the microwells, we developed a technique to coat the wall and bottom with different proteins. To this end, a line-of-sight deposition of titanium (Ti) allowed for the creation of a TiO₂ (bottom)/SiO₂ (wall)

contrast inside the microwell. The passivation of the plateau by inverted microcontact printing and the subsequent vesicle exposure led to vesicle rupture and SPB formation on the SiO₂ wall surface. The protein-resistant properties of the PLL-*g*-PEG on the plateau and the SPB on the SiO₂ side walls allowed for selective fibronectin (Fn) coating on the TiO₂-coated bottom of the microwell. The functionalization of the SPB with cell-cell adhesion molecules provides a microenvironment for the cell which possibly mimics more closely the environment present *in vivo*. Therefore, this culture substrate is potentially suited to the investigation of cell responses, such as cell polarity, division, differentiation and stem cell fate.

Dimensionality and its impact on apoptosis, viability, actin fibril assembly and mechanosensation

Cells cultured inside 3-D microwells showed altered cell responses to environmental stimuli compared to cells on a 2-D surface. We asked whether cell size and shape within 3-D environments could control cell viability. Endothelial cells constrained within microwells were viable up to 7 days. Furthermore, cells in very small microwells (spreading area between 100 and 200 μm^2) were viable, while cells on 2-D patterns with the same projected adhesive area underwent apoptosis. Dimensionality seems to enable the cell to overcome spreading limitation induced apoptosis.

Next, we studied the assembly of the cytoskeleton, since an intact actin cytoskeleton is necessary for cells to migrate, apply contractile forces to their surroundings, and divide. Fibroblast cells constrained within microwells assembled a robust actin network which was in stark contrast to the limited actin filament assembly found within cells on 2-D patterns with equivalent projected spreading areas. Moreover, the cytoskeleton exhibited 3-D arrangement in microwells and was not only limited to the cell-substrate interface as on 2-D surfaces. The ECM is a dynamic structure; it also undergoes changes and is constantly rebuilt and rearranged by the cell itself. Since extracellular Fn matrix fiber formation requires cell contractility, we next asked whether fibroblast cells in microwells rearranged surface adsorbed Fn into fibers in situations where actin filament assembly was observed. Cell containment on 2-D patterned surfaces progressively limited Fn rearrangement with decreasing size. In contrast, cells which adequately filled microwells rarely rearranged Fn from the microwell surfaces. The formation of an actin skeleton and the hindrance of Fn matrix rearrangement made it difficult to draw any definitive conclusions about cell contractility inside the microwells, but it suggested that actin filament assembly is driven

by other cues and might help to explain some other differences seen in cells in 3-D gels versus on 2-D substrates.

Since the mechanosensing abilities of a cell are coupled to the actin skeleton, we investigated actin filament assembly in both hard and soft microwells. Interestingly, cells in soft microwells with limited spreading and substrate stiffnesses of approximately 20 kPa did not assemble a detectable actin cytoskeleton, which was in contrast with cells on flat, homogeneous 2-D substrates where actin filament assembly was observed. Therefore, we have to conclude that it is not mechanosensation alone, but also dimensionality that influences the cell's ability to probe its environment and to respond to the stiffness of its surrounding.

Finally, we investigated the dependence of the metabolism of cells on spreading area and dimensionality. Increasing the spreading area of the cell led to increased metabolic activity on both 2-D patterns and inside 3-D microwells. Furthermore, our results indicate that the metabolic activity of the cell was greater in a 3-D environment, indicating that metabolic activity was also affected by dimensionality.

Conclusion

These observations demonstrate that single-cell microwell substrates are a valuable addition to the toolbox of engineered cell culture platforms and can produce microenvironments for the study of cell behavior in reductionist 3-D environments. The possibility to control the spreading area of the cell, the stiffness of the substrate, and the coating inside the wells made it possible to evaluate the impact of varying a single parameter and furthermore, the interplay between different parameters. Additionally, the microwell thin PDMS film substrates are compatible with conventional culturing assays, live imaging and high-resolution microscopy often used in cell biology. The microwell substrate is a useful platform to study biophysical fundamentals. However, it needs to be taken into consideration that such an engineered platform is never able to simulate exactly the environment of a cell *in vivo* as these substrates are constrained by the reduced and simplified presentations of biochemical ligands and the absence of real cell-cell contacts. Furthermore, the imitation of very soft tissue is limited since the transference of the microwell structure into very soft materials is difficult. Nevertheless, the microwell substrate is a suitable platform to address biological questions, such as the influence of dimensionality on cell division or stem cell differentiation. Furthermore the microwell platform provides a microarray format for high-throughput cell-based assays in drug or toxicity screening.

Zusammenfassung

Die Funktionsfähigkeit von lebendem Gewebe ist ein Zusammenspiel von Zellfunktionen und deshalb an die Stimuli gekuppelt, welche die Zelle in ihrer Umgebung erfährt. Neben Substratsteifigkeit, Matrixzusammensetzung und Zellform zählt die Dimensionalität zu den wichtigen physikalischen Eigenschaften der Mikroumgebung der Zelle, die das Zellverhalten steuert. Studien haben gezeigt, dass sich Zellen in dreidimensionalen (3-D) Systemen anders verhalten als auf flachen Substraten. Deshalb spielt neben dem physikalischen und chemischen Mikroumfeld das strukturelle Umfeld für die Zellform und -funktion eine kritische Rolle.

Fabrikation der Mikrostrukturen

Die Verschmelzung von Mikrofabrikation und Zellbiologie führte zu einer Vielzahl neuer Methoden, mit denen sich das Verhalten von Zellen *in vitro* studieren liess. Jedoch sind die vorhandenen Techniken, welche das Zellverhalten im zweidimensionalen (2-D) Umfeld zum Verhalten in 3-D Umgebungen gegenüberstellt, schwierig zu vergleichen. Geläufige 3-D Modelle, wie z.B. Gele oder faserförmige Netzwerke, ermöglichen keine Kontrolle über die Form einzelner Zellen und sind schwierig mit hochauflösender Mikroskopie zu kombinieren. M. Dusseiller, M. Smith, V. Vogel und M. Textor von der ETH Zürich haben eine Technik entwickelt, die 2-D, chemische Muster mit topographischer Mikrostrukturierung kombiniert und die Möglichkeit eröffnet, den Zellen eine strukturelle und biochemisch definierte, jedoch vereinfachte Mikroumgebung reduzierter Komplexität zu präsentieren. Die Methode kombiniert Mikrostrukturierung in Silizium mit einer Replikationstechnik, welche es ermöglicht, ein Polydimethylsiloxan (PDMS) Substrat herzustellen, das Mikrostrukturen in der Grössenordnung einer Zelle enthält. Ausserdem kann man die mechanischen Eigenschaften des PDMS Substrats steuern, indem man dessen Quervernetzungsdichte variiert.

Zusätzlich zur Geometrie konnte auch die Chemie der Mikroumgebung kontrolliert werden: Die Oberfläche innerhalb der Mikrostrukturen präsentierte eine spezifische chemische Funktionalität, wie z.B. Adhäsionsproteine, während das Plateau zwischen den Strukturen gegen unspezifische Proteinadsorption passiviert ist. Die Passivierung ist ein kritischer Schritt, der gewährleisten soll, dass die Zellen nur innerhalb der Strukturen adherieren, in denen eine kontrollierte Mikroumgebung präsentiert wird. Deshalb hat Dusseiller *et al.* eine Stempelmethode entwickelt, die ein graft-co-polymer, poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) (PLL-g-PEG), mit einem hydrierten Stempel auf das Plateau aufträgt. Wegen des viel versprechenden Potentials dieser neuen Zellkulturplattform wurde in dieser Arbeit die chemische Modifikation in den Mikrostrukturen weiterentwickelt und erste detaillierte Zellstudien ausgeführt.

Präsentation einer beweglichen E-cadherin Schicht innerhalb der Mikrostrukturen

Da viele für Zellstudien interessante Proteine Membranproteine sind, bei denen die Beweglichkeit der Liganden eine wichtige Rolle spielt, wurde eine neue Methodologie entwickelt, die im Inneren der Mikrostrukturen eine Doppellipidschicht aufträgt, die mit E-Cadherin funktionalisiert wird. Die Charakterisierung der Mobilität hat gezeigt, dass die Doppellipidschicht auf oxidiertem PDMS beweglich war und die Kante der Mikrostrukturen die laterale Beweglichkeit der Lipide nicht einschränkte. Durch die Wahl eines Phospholipids mit einer Transitionstemperatur von 35 °C konnten wir die Beweglichkeit innerhalb der Mikrostruktur durch die Temperatur steuern.

Die Kombination der Mikrostruktur mit der beweglichen Doppellipidschicht hat eine neue Technik hervorgebracht, mit der sich das Anhäufen von Membranproteinen und die Aktinorganisation in einer gut kontrollierten, 3-D Umgebung studieren lässt. Erste Experimente mit Zellen (Chinese Hamster Ovary Zellen) haben gezeigt, dass sich die Zellen innerhalb der Mikrostrukturen, die mit einer Cadherin-funktionalisierten Doppellipidschicht beschichtet waren, anhaften konnten. Des Weiteren hat die Mobilität die Aktinorganisation der Zelle in 2-D beeinflusst und somit auch das Verhalten der Zelle im Allgemeinen.

Mikrostrukturen mit heterogener Proteinanordnung

Adhäsionsmoleküle *in vivo* haben oft kontrollierte räumliche Anordnung, wie z. B. in Epithelzellen, welche Zell-Zell-Kontakte lateral und Kontakte zur Basalmembran unterhalb der Zelle aufweisen. Deshalb haben wir neben dem homogenen Beschichten der Mikrostrukturen eine Technik entwickelt, die es ermöglicht, die Wände und den Boden der

Mikrostrukturen mit verschiedenen Proteinen zu beschichten. Mit Hilfe einer senkrechten (“line-of-sight”) Abscheidung von Titan (Ti) wurde ein TiO₂ (Boden)/SiO₂ (Wand) Kontrast kreiert. Die Passivation des Plateaus und die anschliessende Exposition mit einer Vesikellösung hat zur Bildung einer Doppellipidschicht auf dem SiO₂ geführt. Die proteinresistenten Eigenschaften von PLL-g-PEG auf dem Plateau und der Doppellipidschicht auf den SiO₂ Wänden ermöglichte die selektive Adsorption von Fibronectin auf dem Boden der Mikrostruktur. Die Funktionalisierung der Doppellipidschicht mit Zell-Zelladhäsionsmolekülen hat den Zellen eine Mikroumgebung geschaffen, welche die *in vivo* Umgebung besser imitieren dürfte. Deshalb ist diese Plattform potenziell geeignet um Zellverhalten, wie z.B. Polarität, Zellteilung, sowie Differenzierung von Stammzellen besser zu untersuchen.

Dimensionalität und ihr Einfluss auf Apoptosis, Lebensfähigkeit, Aktinfaserbildung und Mechanosensation

Je nachdem ob die Zellen in 3-D Mikrostrukturen oder auf 2-D Oberflächen gezüchtet wurden, haben Stimuli aus der Umgebung unterschiedliches Zellverhalten provoziert. Deshalb wurde untersucht, ob die Zellgrösse und -form innerhalb 3-D Mikrostrukturen die Lebensfähigkeit von Zellen beeinflussen kann. Endothelzellen, die in einer Mikrostruktur gezüchtet wurden, haben 7 Tage lang überlebt. Sogar in kleinen Strukturen (Ausbreitungsfläche (“spreading area”) < 200 μm^2) haben die Zellen überlebt, während die Zellen auf 2-D Mustern mit derselben Ausbreitungsfläche gestorben sind. Dimensionalität scheint folglich die im 2-D-Fall als Folge mangelndem Ausbreitungsgrad induzierte Apoptose zu überwinden.

Da ein intaktes Zytoskelett eine wichtige Voraussetzung für Zellmigration, Zellteilung und Zellkontraktilität ist, haben wir die Bildung des Zytoskeletts in den Mikrostrukturen untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass Zellen innerhalb der 3-D Strukturen ein Aktinskelett aufbauen konnten, während Zellen auf 2-D Mustern mit der gleichen projizierten Fläche hingegen nur limitierte Aktinbildung aufwiesen. Das Zytoskelett hatte eine 3-D Anordnung und war nicht nur auf die Zell-Substrat Grenzfläche limitiert. Die extrazelluläre Matrix ist eine dynamische Struktur, die konstant von den Zellen neu gebildet und angeordnet wird. Da Zellkontraktilität eine Voraussetzung für Fibronectin Matrixfasernbildung ist, wurde untersucht, ob der Aufbau eines Aktinskeletts ein Hinweis darauf ist, dass Fibroblasten in Mikrostrukturen mit adsorbiertem Fibronectin Fasern bilden können. Zellen, bei denen mit Hilfe von 2-D Mustern die Ausbreitungsfläche kontrolliert wurde, haben mit kleiner werdender Fläche weniger Fibronectin reorganisiert. Zellen in den

Mikrostrukturen haben im Gegensatz dazu selten Fibronectin innerhalb der Mikrostrukturen reorganisiert und Fasern gebildet. Der Widerspruch zwischen dem Aufbau eines Zytoskeletts und der Verhinderung von Fibronectin Reorganisation hat es schwierig gemacht, definitiven Schlussfolgerungen über Zellkontraktilität in den Mikrostrukturen zu ziehen. Er hat jedoch darauf hingewiesen, dass Aktinfaserbildung wahrscheinlich durch andere Faktoren beeinflusst ist und zudem helfen könnte, andere Unterschiede zwischen dem Zellverhalten in 3-D Gelen und auf 2-D Substraten zu erklären.

Die Fähigkeit einer Zelle zur Mechanosensation sind ans Aktinskelett gekuppelt. Darum wurde die Aktinorganisation in weichen und harten Mikrostrukturen untersucht. Interessanterweise habe Zellen in weichen Mikrostrukturen (Substratsteifigkeit von etwa 20 kPa) mit limitierter Ausbreitungsfläche keine feststellbaren Aktinfasern ausgebildet; ganz im Gegensatz zu Zellen auf flachen, homogenen Oberflächen. Deshalb liegt der Schluss nahe, dass nicht Mechanosensation alleine, sondern ebenso Dimensionalität, die Fähigkeit der Zelle ihre Umgebung abzutasten und auf deren Steifigkeit zu reagieren, beeinflusst.

Schlussendlich wurde untersucht, wie der Metabolismus einer Zelle von deren Ausbreitungsfläche und Dimensionalität abhängt. Mit grösserer Ausbreitungsfläche einer Zelle nahm deren Aktivität sowohl auf 2-D Mustern als auch in 3-D Mikrostrukturen zu. Ausserdem wurde beobachtet, dass die metabolische Aktivität in einer 3-D Umgebung grösser ist als in 2-D.

Schlussfolgerungen

Diese Beobachtungen haben gezeigt, dass die für Einzelzellen konzipierten Mikrostrukturen eine wertvolle Ergänzung zu den schon vorhandenen Zellkultursubstraten und nützlich sind, um das Verhalten einer Einzelzelle in einer vereinfachten 3-D Umgebung zu studieren. Die Möglichkeit, die Ausbreitungsfläche der Zelle, die Steifigkeit des Substrates und die Beschichtung innerhalb der Mikrostrukturen zu steuern, hat es ermöglicht, den Einfluss einzelner Parameter auf das Zellverhalten und deren Zusammenspiel zu untersuchen. Die Mikrostrukturen sind ausserdem mit konventionellen Untersuchungsmethoden kompatibel, d.h. erlauben die Beobachtung lebender Zellen mit hochauflösender Mikroskopie. Das mikrostrukturierte Substrat ist dabei geeignet, biophysikalische Grundfragen zu erörtern. Nichtsdestotrotz muss bedacht werden, dass eine künstlich konzipierte Plattform nie die genaue *in vivo* Umgebung einer Zellen imitieren kann. Die Aussagekraft solcher Substrate wird immer mehr oder weniger eingeschränkt sein durch die reduzierte und vereinfachte Präsentation biochemischer Liganden und der Abwesenheit richtiger Zell-Zell-Kontakte. Ausserdem ist die Imitation von sehr weichem Gewebe schwierig zu gestalten,

da die Replikation der Mikrostruktur in sehr weiches Material nur beschränkt möglich ist. Trotzdem ist das mikrostrukturierte Substrat geeignet, biologische Fragestellungen zu untersuchen, wie z.B. in Bezug auf die Frage, inwieweit die Dimensionalität die Zellteilung und Stammzellendifferenzierung beeinflusst. Ferner sind zukünftige Anwendungen solcher Zell-basierter Technolgien im Gebiet der Medikamenten-Entwicklung und der Toxizitätsprüfung denkbar.