



Doctoral Thesis

Cell shape, dimensionality and mechanical stimulation avenues to steer (stem) cell differentiation

Author(s):

Rottmar, Markus

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007090438> →

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. 19748

CELL SHAPE, DIMENSIONALITY AND MECHANICAL STIMULATION –
AVENUES TO STEER (STEM) CELL DIFFERENTIATION

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
MARKUS ROTTMAR
Mag. Biol., Leopold-Franzens University Innsbruck, Austria
born on October 6th, 1981
citizen of Austria

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Viola Vogel, examiner
Prof. Dr. Marcus Textor, co-examiner
Dr. Katharina Maniura-Weber, external co-examiner
Dr. Marcy Zenobi-Wong, co-examiner

2011

Abstract

A single cell represents the basic building block of life and functions *in vivo* in a dynamic 3-dimensional environment consisting of a complex matrix and adjacent cells. Continuously sensing their immediate surroundings, cells adapt to a wide variety of extrinsic cues, which determine their overall function in tissues and the organism as a whole. Understanding of cell behavior, such as the process of (stem) cell differentiation, in response to specific extrinsic cues can be of crucial importance for the success of a wide variety of applications, which include but are not limited to cell-based sensors, tissue engineering approaches or cell-based therapies. However, the sheer complexity of the cellular environment *in vivo* hampers systematical investigation of cell behavior in response of extrinsic cues, requesting for simplistic *in vitro* cell culture models that mimic certain aspects of the *in vivo* system.

Recently, a 3-dimensional microwell platform has been established, which allows to systematically address questions on role and interrelationship of cell shape, substrate stiffness and dimensionality on cell behavior. In the current work, this platform has been modified to allow long term cultivation of single stem cells for investigation of differentiation processes. While first results showed that cells were able to differentiate into osteoblasts and adipocytes, the culture platform displayed inconsistent stability of cell confinement over time.

Tissue engineering approaches or cell-based therapies often rely on cell expansion *in vitro*, however limiting their potential use, cells can lose their specialized phenotype when cultivated on artificial substrates. Upon 2D culture expansion, chondrocytes change from a characteristic round-shaped to a fibroblast-like morphology, which is accompanied by drastic changes in the expression of specific marker proteins. This process can be reversed by forcing cells into a round shape, by cultivation within hydrogels or in presence of actin disrupting agents. In this work, employing such agents it could be shown that re-expression of the chondrogenic phenotype is regulated by the actin cytoskeleton via the involvement of PI3K-, PKC- and MAPK-signaling. Tissue engineering approaches could benefit from these novel findings, as they show a possibility to pharmacologically control the chondrocyte phenotype.

Mechanical stresses and strains govern the process of bone remodeling and bone homeostasis. Disuse of the skeletal system or mechanical stimulation of bone tissues results in a catabolic or anabolic response, respectively. In the present study, a system to apply intermittent cyclic hydrostatic pressure on cells in culture was evaluated and first results showed increased cell proliferation and osteogenic differentiation upon mechanical stimulation when compared to unstimulated control.

Evaluation of cell responses usually relies on endpoint measurement techniques, which lack temporal resolution. Therefore, strategies for cell-based sensors would greatly benefit from online monitoring tools. In this study, GFP-based reporter constructs were generated that allowed visualization of cell structural proteins and monitoring of osteogenic differentiation in living cells.

Taken together, a set of tools has been generated, modified and evaluated that allows investigation of cell responses to a variety of extrinsic cues both in fixed and in living cells. The results presented in this thesis have important implications for cartilage tissue engineering approaches as they show the possibility to pharmacologically control the chondrocyte phenotype. Furthermore, the tools described in the course of this work can be used to evaluate mechanical loading regimes, as screening platform, as well as cell-based sensors.

Zusammenfassung

Die Zelle ist der Grundbaustein des Lebens und funktioniert *in vivo* in einer dynamischen 3-dimensionalen Umgebung, bestehend aus einer komplexen Matrix und weiteren angrenzenden Zellen. Dabei erfasst die Zelle kontinuierlich ihre unmittelbare Umgebung und passt sich einer Vielzahl von äusseren Reizen an; Anpassungen welche die Funktionen im Gewebe und dadurch im Organismus als Ganzes bestimmen. Ein grundlegendes Verständnis der Zell-Reaktionen, wie die Differenzierung von Zellen, zu bestimmten äusseren Reizen kann für eine Vielzahl von Anwendungen wie zum Beispiel für zell-basierte Sensoren/Therapien sowie für die Herstellung von Geweben von entscheidender Bedeutung für deren Erfolg sein. Allerdings verunmöglicht die enorme Komplexität der zellulären Umgebung *in vivo* eine systematische Untersuchung von Änderungen im Zellverhalten aufgrund äusserer Reize. Eine systematische Untersuchung erfordert daher stark vereinfachte Zell-Kultur Modelle, welche bestimmte Aspekte der *in vivo* Situation simulieren.

Kürzlich wurde ein Modell etabliert, welches aus einer Matrix aus 3-dimensionalen Mikrostrukturen in Form von unterschiedlich grossen und unterschiedlich geformten Vertiefungen besteht. Dieses Modell ermöglicht eine systematische Analyse der Effekte und Wechselbeziehungen von Zellform, Steifigkeit des Substrats und Dimensionalität auf das Verhalten der Zelle. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Modell modifiziert, um eine langfristige Kultivierung einzelner Zellen und damit verbunden eine Untersuchung der Stammzell-Differenzierung innerhalb der Mikrostrukturen zu ermöglichen. Obwohl die ersten Ergebnisse zeigten, dass die Stammzellen in der Lage waren zu Knochenzellen und Fettzellen zu differenzieren, musste eine unzureichende Stabilität der durch die Mikrostruktur vorgegebenen Zellform über die Zeit festgestellt werden.

Strategien zu Herstellung von Geweben oder auch zell-basierte Therapien benötigen meist die Expansion von Zellen *in vitro*. Dies kann allerdings den Nutzen dieser Zellen einschränken, da Zellen ihren speziellen Phänotyp verlieren können,

wenn sie auf künstlichen, planaren Substraten kultiviert werden. Durch die Kultivierung auf 2-dimensionalen Substraten, verlieren Knorpelzellen ihre charakteristische runde Zellform und akquirieren eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie, was von drastischen Veränderungen in der Expression Knorpel-spezifischer Proteine begleitet wird. Dieser Prozess ist reversibel und kann durch das Erzwingen einer runden Zellform, entweder durch die Kultivierung innerhalb von Hydrogelen oder in durch die Zugabe von Aktin-zerstörenden Pharmazeutika, rückgängig gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe solcher Pharmazeutika gezeigt werden, dass die Re-expression des Knorpel-spezifischen Phänotyps vom Aktin-Zytoskelett mit seinen komplexen Verbindungen zu den PI3K-, PKC- und MAPK-Signalwegen reguliert wird. Diese Ergebnisse könnten zur Verbesserung der Herstellung von Geweben beitragen, da sie die Möglichkeit aufzeigen, mit Pharmazeutika den Phänotyp der Knorpelzelle zu kontrollieren.

Mechanische Belastungen regulieren den Knochenumbau sowie die Homöostase des Knochens. Eine ungenügende Belastung des Skelett-Systems führt zu einer katabolen, wohingegen eine mechanische Stimulation des Knochengewebes zu einer anabolen Reaktion führt. In dieser Arbeit wurde ein System, welches die Applikation von intermittierendem zyklischem hydrostatischem Druck auf Zellen ermöglicht, evaluiert und charakterisiert. Erste Ergebnisse zeigten einen positiven Effekt von mechanischer Stimulation auf die Zellproliferation und Knochen-spezifische Differenzierung durch mechanische Stimulation.

Die Beurteilung von Änderungen im Zell-Verhalten stützt sich üblicherweise auf Endpunkt-Messtechniken mit begrenztem zeitlichen Auflösungsvermögen. Strategien für Zell-basierte Sensoren würden daher stark von Echtzeit-Analysemethoden profitieren. In der vorliegenden Arbeit wurden fluoreszenz-basierte Reporter-Konstrukte generiert und evaluiert, welche die Visualisierung von strukturellen Proteinen und die Beobachtung der osteogenen Differenzierung in lebenden Zellen ermöglichen.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit eine Reihe von Methoden generiert, modifiziert und evaluiert, welche die Untersuchung einer Zell-Reaktion auf eine Vielzahl von äußeren Reizen, sowohl in fixierten als auch in lebenden Zellen, ermöglicht. Die präsentierten Ergebnisse könnten darüberhinaus eine grosse Bedeutung für die Herstellung von Knorpel-Gewebe haben, da sie die Möglichkeit zeigen, wie der Phänotyp von Knorpelzellen mithilfe von Pharmazeutika gesteuert werden kann. Des Weiteren können die Methoden, die im Laufe dieser Arbeit beschrieben wurden als Screening-Plattform, für zell-basierte Sensoren oder zur Bewertung von Parametern bei mechanischer Belastung verwendet werden.